

GRACIELE VICCINI

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS ESPOROS DO FUNGO *Clonostachys rosea* E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DE SEUS
POLISSACARÍDEOS**

CURITIBA

2009

GRACIELE VICCINI

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DOS ESPOROS DO FUNGO *Clonostachys rosea* E
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DE SEUS
POLISSACARÍDEOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki

CURITIBA

2009

Aos meus queridos pais, Moacyr e Adélia, pelo amor incondicional,
estímulo constante e carinho. Por quem sou e pelo que conquistei.

Ao meu noivo, Paulo, pelo imenso amor,
incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente. Ninguém e nada cresce sozinho; sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão ou uma atitude de amor.

A todos que compartilharam meus ideais, dedico esta vitória, com a mais profunda gratidão e respeito! Meus sinceros agradecimentos...

“Enquanto houver você do outro lado, aqui do outro eu consigo me orientar!” *

... à Deus, porque sem Ele eu nada seria! Por estar presente em minha vida, iluminando meu caminho para que eu me torne uma pessoa melhor a cada dia.

“Antes do inteiro, a metade. Uma outra parte de nós!”

... aos meus queridos pais, Moacyr Viccini e Adélia Maria Bet Viccini, ofereço a vocês o sorriso que trago agora em minha face, juntamente com o trabalho, a luta, as alegrias e tristezas, as dúvidas e certezas que estiveram presentes no caminho para a realização deste sonho. Dou-lhes também uma parte do meu futuro, pois vocês abriram mão de muitas coisas para reservar a mim e meus irmãos um mundo melhor. Essa conquista nos pertence. Muito obrigada. Amo vocês!

... aos meus irmãos, Altair e Carla, à minha cunhada, Luana, e as minhas sobrinhas, Talita e Liriel, por formarem, juntamente com meus pais, a instituição que é base da minha vida: minha F-A-M-Í-L-I-A, que é linda, unida e perfeita até mesmo nas suas imperfeições!

“Como arroz e feijão, a perfeita combinação, soma de duas metades...”

... ao meu noivo, Paulo, pelo imenso amor, apoio, incentivo, compreensão, companheirismo e carinho, nos momentos felizes e também nos desabafos desta fase tão importante. Obrigada por ser meu alicerce, meu ponto de equilíbrio, meu amigo e meu amor.

... ao Júlio e a Ivanir, por todo o carinho, apoio e estímulo.

* Frases retiradas de diversas músicas do grupo “O Teatro Mágico”. (www.oteatromagico.us.br)

“Tanto faz não satisfaz o que preciso. Além do mais, quem busca nunca é indeciso. Eu busquei quem sou!”

... ao meu orientador, Prof. Dr. David Alexander Mitchell, pelos nove anos de orientação, desde a iniciação científica, por sua amizade, apoio, incentivo e disponibilidade. Pelo exemplo de competência e dedicação à carreira acadêmica e pelo cuidado especial em ensinar a maneira crítica com a qual a ciência deve ser encarada. E, principalmente, pela liberdade e confiança, fatores que permitiram que eu conduzisse meu trabalho a minha maneira! Por fim, agradeço por toda contribuição que recebi para minha formação profissional e pessoal.

“Da luta não me retiro. Me atiro do alto e que me atirem no peito. Da luta não me retiro...”

... ao meu co-orientador, Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki, pela colaboração no projeto, pelas correções do *paper* e pelas análises de RMN.

... à Dra. Elaine R. Carbonero, pela amizade, atenção e paciência dispensadas. Por me “introduzir no mundo dos carboidratos” e pelas análises de RMN e de HPSEC.

... ao Prof. Dr. Miguel Nosedá, pelas análises de RMN.

... às técnicas Rosane e Andréia, pelas análises de GC, GC-MS e HPSEC.

... aos professores Marcelo Iacomini e Miguel Nosedá, pela disponibilização dos laboratórios do Grupo de Química de Carboidratos.

... à pesquisadora Rosa Valdebenito-Sanhueza (EMBRAPA/CNPV), por ter cedido a cepa de *Clonostachys rosea*, pois sem esse “lindo e meigo funguinho cor-de-rosa” nada seria possível.

... à pesquisadora Deise Capalbo (EMBRAPA/CNPMA), por ter me ensinado os “primeiros passos” no trabalho com o fungo *Clonostachys rosea*, além de sempre estar disposta a esclarecer minhas dúvidas.

... à Renata Gava (EMBRAPA/CNPV), por ter cedido a cepa de *Botrytis cinerea*.

... aos Professores Lucimara e Leonardo, pelas correções desta tese.

“Nossa sina é se ensinar... A sina nossa é...”

... aos meus alunos, pelo aprendizado constante durante o período que trabalhei como professora nesta instituição.

“Teu sorriso eu vou deixar na estante para eu ter um dia melhor!”

... ao meu grande amigo e companheiro de laboratório Rodrigo Faria, por todos os ensinamentos, ajuda, conselhos, conversas, carinho e confiança, tanto nos aspectos profissionais quanto pessoais. Nunca vou esquecer que “nós temos um plano”!

“Borboleta parece flor, que o vento tirou pra dançar. Flor parece a gente, pois somos semente do que ainda virá!”

... aos colegas atuais e aos que passaram pelo Laboratório de Fermentações ou pela “Lan House” do David, em especial: Wellington, Ricardo Suzuki, Marcelo Barga, Beatriz, Juliana, Alexandre, Renato, Diniara, Tiago, pela colaboração, conversas e carinho.

... aos colegas do grupo de Química de Carboidratos, por toda paciência para ensinar os procedimentos, disponibilizar equipamentos e reagentes, ajudar nos experimentos e na interpretação de resultados

... aos meus estagiários durante o período de doutorado, Regielly, Érika, Michelli, Marcos, Lucas e Mariele, pelo auxílio (de diferentes formas e proporções), disponibilidade, curiosidade científica e troca de experiências.

... a minha querida amiga (e estagiária) Thalita, por toda a ajuda na pesquisa de carboidratos, uma área nova que exploramos juntas. Pela amizade, respeito, confiança e carinho!

... ao meu querido amigo (e estagiário) Michael, por toda a ajuda e amizade desde o início do mestrado.

... aos amigos queridos que cruzaram meu caminho pelos corredores do Departamento, Lauro, Rodrigo Vassoler, Phelipe, Ana Helena, Elaine, Dayane, Juliana Cassolato, Rose Adele, Danilo, Mariana, João, Fernanda Simas, Luciana, Carolina, Ane e Maria Augusta, pela amizade, conversas, ombros e ouvidos disponíveis, trocas e doações, discussões sobre as pesquisas, divagações sobre a vida, enfim, momentos mágicos.

... aos amigos “externos”, alguns mais próximos, outros nem tanto, mas sempre presentes no coração: Fred, Josnei, Anne, Thais, Youssef, Mário, André, Denise, Carimi, Evandro, Rodrigo e Jana, por todos os momentos especiais.

... aos amigos de todas as épocas, tantos, por tantas diferentes formas, mas inesquecíveis e vitais. Impossível listar todos!

"Os opostos se distraem. Os dispostos se atraem!"

... as minhas eternas amigas, Fernanda Albin, Rafaella, Giovana, Ângela, Rose e Fernanda Borges por tudo que a amizade mais sincera e verdadeira encerra (sem palavras para explicar...).

"Só enquanto eu respirar, vou me lembrar de você..."

... à minha querida noninha Regina (*in memoriam*), pois jamais esquecerei sua força e bondade, seu lindos e longos cabelos brancos, perfeitamente presos em um coque e seu cheirinho de vovó!

... ao Valdecir (*in memoriam*), pois sei que aonde estiver estará feliz por mim.

"Brincando entre os campos das nossas idéias, somos vaga-lumes a voar."

... à Universidade Federal do Paraná, pela estrutura e oportunidade;

... à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Professores e colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo apoio e estímulo.

... à secretária do Departamento, Nancy, e a secretária da Pós-Graduação, Marilza, pela ajuda prestada ao longo desta jornada.

... ao CNPq, pela concessão da bolsa.

"E tudo que eu criar pra mim, vai me abraçar de novo semana que vem."

Graciele Viccini

Curitiba, 27 de fevereiro de 2009.

*Metade de mim
agora é assim:
de um lado a poesia, o verbo, a saudade
do outro a luta, a força e a coragem pra chegar no fim.
E o fim é belo, incerto... depende de como você vê
o novo, o credo, a fé que você deposita em você e só!*

O Anjo Mais Velho

*O Teatro Mágico
(Fernando Anitelli)*

RESUMO

O fungo *Clonostachys rosea* é um agente de controle biológico contra fungos fitopatogênicos, insetos e nematóides. Esta tese tem duas vertentes relacionadas à ação de biocontrole de *C. rosea*: um estudo completo para o desenvolvimento de um produto de biocontrole com base nos seus esporos e um estudo dos carboidratos extraídos da sua parede celular e liberados no meio de cultivo. Em relação ao produto de biocontrole, foram feitas três fermentações em estado sólido (FES), utilizando arroz como substrato: FES-1, FES-2 e FES-3. Durante a fermentação, os frascos de FES-1 e FES-2 foram fechados com tampão de algodão e os frascos de FES-3, com papel higiênico. Após a fermentação, FES-1 foi submetida a uma secagem branda. O arroz colonizado proveniente de cada FES foi submetido a três processos de formulação antes do armazenamento: no tratamento C não foi aplicado nenhum processo, no tratamento T o arroz foi triturado e no tratamento M o arroz foi triturado e misturado com amido de milho. Cada formulação foi armazenada em duas condições: temperatura ambiente e 4 °C. A avaliação dos tratamentos foi feita por testes de viabilidade e de eficácia dos esporos durante 150 dias de armazenamento. A viabilidade dos esporos diminuiu em todos os tratamentos durante o armazenamento. A velocidade da perda foi menor nos tratamentos armazenados a 4 °C. O índice de contaminação foi baixo em FES-3 e FES-1. Ao contrário, FES-2 apresentou alto índice de contaminação devido ao elevado teor de umidade do arroz colonizado. Os tratamentos C e M da FES-3, armazenados a 4 °C, apresentaram os melhores resultados, com viabilidade dos esporos superior a 80% após 150 dias. A eficácia dos esporos foi avaliada através de um teste de titulação. Seu objetivo foi determinar o *titer*, isto é, a menor concentração de esporos de *C. rosea* capaz de reprimir totalmente o crescimento de *Botrytis cinerea* em uma placa. Os resultados deste teste apresentaram boa correlação com os resultados de germinação de esporos, tornando esse sistema de avaliação um protocolo factível para o estudo da interação entre fungos. Em relação ao estudo dos carboidratos, foi feita a purificação e a caracterização química de galactomananas de *C. rosea*, encontradas na biomassa e no caldo de cultivo de uma fermentação líquida de superfície. As galactomananas apresentaram proporções molares de Man, Gal e Glc praticamente idênticas, sendo 25:47:28 para o polissacarídeo da biomassa e 23:48:29 para o polissacarídeo do caldo de cultivo. A similaridade foi confirmada por espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C, HMQC e COSY. Foi proposto que a galactomanana encontrada no caldo de cultivo teve origem a partir da autólise da biomassa, baseado não somente na similaridade com a galactomanana extraída da biomassa, mas também no fato de que sua concentração aumentou rapidamente após depleção da glucose do meio de cultivo, enquanto a concentração de biomassa diminuiu. Polissacarídeos de *C. rosea* não foram caracterizados previamente, mas este trabalho mostrou que as características das galactomananas de *C. rosea* são consistentes com aquelas relatadas para outros membros da família Bionectriaceae, a família a que *C. rosea* pertence.

Palavras-chave: *Clonostachys rosea*. Formulação de esporos. Galactomanana.

ABSTRACT

The fungus *Clonostachys rosea* is a biological control agent effective against phytopathogenic fungi, insects and nematodes. Two studies related to the biological control activity of *C. rosea* were undertaken: a study to develop a biocontrol product based on the spores of this fungus and a study of the polysaccharides of the cell wall. In relation to the biocontrol product, three solid-state fermentations (FES) were undertaken, using rice as a substrate: FES-1, FES-2 and FES-3. During the fermentations FES-1 and FES-2 the flasks were closed with cotton wool plugs while those of FES-3 were closed with tissue paper. After the fermentation, FES-1 was dried under mild conditions. The colonized rice from each of the three solid-state fermentations was submitted to three different formulation processes before storage: In treatment C no additional processing was undertaken, in treatment T the rice was ground and in treatment M the rice was ground and mixed with corn starch. Each formulation was stored at room temperature and at 4°C. The treatments were evaluated on the basis of a viability test and a test of spore efficacy, during 150 days of storage. The viability of the spores decreased during storage for all preparations and conditions. The velocity of loss of viability was lower in the preparations that were stored at 4°C. The frequency of contamination was low for preparations FES-1 and FES-3. On the contrary, the preparation FES-2 suffered from a high rate of contamination, due to the high water content of the fermented rice. Treatments C and M of the preparation FES-3, stored at 4°C, gave the best results, with spore viabilities remaining above 80% over the 150 days of storage. The spore efficacy was evaluated based on a titration test. The objective of this test was to determine the titer, that is, the lowest concentration of spores of *C. rosea* that was able to repress totally the growth of *Botrytis cinerea* on an agar plate. The results of this test correlated well with the results of the spore viability test, indicating that this titration test can be used for the study of interaction between a biocontrol fungus and its fungal target. In relation to the study of the cell wall polysaccharides of *C. rosea*, two galactomannans were purified and characterized from a surface liquid culture, one from the biomass and one from the fermentation broth. These two galactomannans had nearly identical molar proportions of Man, Gal and Glc and their similarity were confirmed by RMN-¹H, RMN-¹³C, HMQC and COSY spectra. It was proposed that the galactomannan found in the fermentation broth originated from the autolysis of the biomass, based not only on its similarity with the galactomannan extracted from the biomass, but also on the fact that its concentration increased rapidly after the exhaustion of glucose from the medium, when the concentration of biomass was decreasing. Polysaccharides of *C. rosea* have not been characterized previously, but this work demonstrated that the galactomannans of *C. rosea* are similar to those that have been reported for other members of the Bionectriaceae, the family to which *C. rosea* belongs.

Keywords: *Clonostachys rosea*. Spore formulation. Galactomannan

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- <i>Clonostachys rosea</i>	23
FIGURA 2	- ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UM PROGRAMA DE PESQUISA PARA DESENVOLVER UM AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO.....	30
FIGURA 3	- MICOPARASITISMO DE <i>Clonostachys rosea</i> EM <i>Botrytis cinerea</i>	45
FIGURA 4	- RMN DE ¹ H DO POLISSACARÍDEO DA FRAÇÃO F1SS DE <i>Clonostachys rosea</i> (300 MHz, D ₂ O, 40 °C).....	47
FIGURA 5	- FLUXOGRAMA GERAL DA ESTRATÉGIA DE TRABALHO.....	52
FIGURA 6	- TESTE DE DEPOSIÇÃO DE GOTA SOBRE LÂMINA.....	57
FIGURA 7	- PROTOCOLO DO TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> POR TITULAÇÃO.....	60
FIGURA 8	- PROTOCOLO DO TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> EM MAÇÃ.....	62
FIGURA 9	- FLUXOGRAMA DO TESTE COMPLETO DE FORMULAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i>	64
FIGURA 10	- PROCESSOS DE TRITURAÇÃO DO SUBSTRATO COLONIZADO POR <i>Clonostachys rosea</i> E DE ADIÇÃO DE AMIDO DE MILHO.....	65
FIGURA 11	- PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA E DOS EXOPOLISSACARÍDEOS DE <i>Clonostachys rosea</i>	69
FIGURA 12	- COMPARAÇÃO DO TESTE DE GERMINAÇÃO DO PRODUTO COMERCIAL CLONOSTAT PM® E DO ISOLADO EM ESTUDO.....	74
FIGURA 13	- TESTE PRELIMINAR DE CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> EM MEIO DE CULTIVO BDA.....	77
FIGURA 14	- CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> UTILIZANDO DOIS MEIOS DE CULTIVO NUTRICIONALMENTE DIFERENTES: BDA (MEIO RICO) E ÁGAR-ÁGUA (MEIO POBRE).....	78

FIGURA 15 -	TESTE PRELIMINAR DE TITULAÇÃO DE <i>Clonostachys rosea</i> CONTRA <i>Botrytis cinerea</i>	80
FIGURA 16 -	BIOCONTROLE DE <i>Botrytis cinerea</i> EM MAÇÃS UTILIZANDO <i>Clonostachys rosea</i>	82
FIGURA 17 -	VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ÁGUA EM ERLLENMEYERS FECHADOS DE CINCO FORMAS DIFERENTES, SUBMETIDOS À SECAGEM LENTA EM ESTUFA, 30 °C, POR 7 DIAS.....	84
FIGURA 18 -	ESTUDOS DE FORMULAÇÃO TESTADOS EM CADA FES.....	86
FIGURA 19 -	VIABILIDADE DE ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> NOS TRATAMENTOS DA FES-1, DURANTE O PROCESSO DE SECAGEM LENTA, E NOS TRATAMENTOS DAS FES-1, FES-2 E FES-3, DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	87
FIGURA 20 -	COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO DE FORMULAÇÃO EMPREGADA E A CONDIÇÃO DE ARMAZENAMENTO PARA FES-1 E FES-3.....	90
FIGURA 21 -	PERFIS DE (●) BIOMASSA TOTAL, (◆) EPS E (■) CONSUMO DE GLUCOSE DE <i>Clonostachys rosea</i> DURANTE FLS COM 10 g L ⁻¹ DE GLUCOSE INICIAL.....	100
FIGURA 22 -	ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DA BIOMASSA DE <i>Clonostachys rosea</i> POR HPSEC.....	102
FIGURA 23 -	ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DO EPS DE <i>Clonostachys rosea</i> POR HPSEC.....	103
FIGURA 24 -	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DAS FRAÇÕES DO POLISSACARÍDEO DA BIOMASSA E DO EPS, OBTIDAS EM ETAPAS INICIAIS E NO FINAL DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO.....	105
FIGURA 25 -	PERFIS DE (●) BIOMASSA TOTAL, (◆) EPS E (■) CONSUMO DE GLUCOSE DE <i>Clonostachys rosea</i> DURANTE FLS COM 30 g L ⁻¹ DE GLUCOSE INICIAL.....	106
FIGURA 26 -	PERFIS DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EPS: (A) MAN (B) GAL E (C) GLC; PARA A (●) FLS ORIGINAL (10 g L ⁻¹) E PARA A (O) SEGUNDA FLS (30 g L ⁻¹), EM COMPARAÇÃO COM A COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PB (- - -).....	107
FIGURA 27 -	ESPECTRO DE RMN- ¹ H DE (A) FRAÇÃO PURIFICADA DO POLISSACARÍDEO DA BIOMASSA 1000E-PB E (B) FRAÇÃO PURIFICADA DO EPS 1000E-EPS.....	108

FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN- ^{13}C -DEPT DE (A) FRAÇÃO
PURIFICADA DO POLISSACARÍDEO DA BIOMASSA
1000E-PB E (B) FRAÇÃO PURIFICADA DO EPS 1000E-EPS... 112

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- DIFERENTES FORMULAÇÕES E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DE <i>Clonostachys rosea</i>	38
TABELA 2	- ANÁLISE DA QUALIDADE DO PRODUTO CLONOSNAT PM...	75
TABELA 3	- TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> EM MAÇÃS APÓS O PROCESSO DE FORMULAÇÃO PARA AS TRÊS FERMENTAÇÕES.....	92
TABELA 4	- TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> POR TITULAÇÃO PARA AS FORMULAÇÕES DA FES-1 DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	93
TABELA 5	- TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> EM MAÇÃS PARA AS FORMULAÇÕES DA FES-1 DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	94
TABELA 6	- TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> POR TITULAÇÃO PARA AS FORMULAÇÕES DA FES-2 DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	95
TABELA 7	- TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> EM MAÇÃS PARA AS FORMULAÇÕES DA FES-2 DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	95
TABELA 8	- TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> POR TITULAÇÃO PARA AS FORMULAÇÕES DA FES-3 DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	96
TABELA 9	- TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> EM MAÇÃS PARA AS FORMULAÇÕES DA FES-3 DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	97
TABELA 10	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, EM VÁRIOS ESTÁGIOS DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO, DO POLISSACARÍDEO DA BIOMASSA E DO EPS OBTIDOS APÓS 21 DIAS DE CULTIVO EM FLS DE <i>Clonostachys rosea</i>	101
TABELA 11	- ANÁLISE DE METILAÇÃO COMPARATIVA DAS FRAÇÕES HOMOGÊNEAS 1000E-PB E 1000E-EPS.....	109
TABELA 12	- SINAIS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C (δ) PARA AS FRAÇÕES HOMOGÊNEAS 1000E-PB E 1000E-EPS.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ø	- Diâmetro
δ	- Deslocamento químico (ppm)
®	- Marca registrada
¹ H	- Hidrogênio-1
¹³ C	- Carbono-13
A	- Temperatura ambiente
Ac ₂ O	- Anidrido acético
<i>Bc</i>	- <i>Botrytis cinerea</i>
BDA	- Batata dextrose ágar
C	- Controle – substrato colonizado
C-1/H-1	- Relação entre carbono 1 e hidrogênio 1
MeOH	- Metanol
CG-EM	- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
Com.	- Comércio
COSY	- <i>Correlation nmr spectroscopy</i>
<i>Cr</i>	- <i>Clonostachys rosea</i>
D ₂ O	- Água deuterada
E	- Fração eluída
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPS	- Exopolissacarídeo
Es	- Esporo
EtOH	- Etanol
<i>f</i>	- Furanosídico
F	- Frio (4 °C)
F1SS	- <i>Cell wall alkali-extractable water-soluble polysaccharide</i>
FES	- Fermentação em Estado Sólido
FL	- Fermentação Líquida

FLS	- Fermentação Líquida de Superfície
<i>g</i>	- Aceleração da gravidade (unidade de medida da força centrífuga relativa)
Gal	- Galactose
Glc	- Glucose
HMQC	- Heteronuclear multiple-quantum coherence
HPSEC-MALLS	- Cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada à detectores de índice de refração e espalhamento de luz
Ind.	- Indústria
K2	- Fração alcalina (extraída com KOH 2 %)
kDa	- Quilo dalton
Ltda	- Limitada
M	- Substrato colonizado, triturado e misturado com amido de milho
Man	- Manose
ME	- Membrana externa
Me ₄	- Tetrametil
Me ₃	- Trimetil
Me ₂	- Dimetil
ME ₂ SO	- Dimetilsulfóxido
ME ₂ SO- <i>d</i> 6	- Dimetilsulfóxido deuterado
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
MI	- Membrana interna
m/v	- Massa por volume
NaBD ₄	- Boroidreto de sódio deuterado
<i>p</i>	- Piranosídico
P	- Fração precipitada
PB	- Polissacarídeos da biomassa
PE	- Precipitado etanólico
p/p	- Peso por peso
ppm	- Partes por milhão

PVDF	- <i>Polyvinilidene difluoride</i>
PVC	- Policloreto de vinila
RMN- ¹³ C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN- ¹³ C-DEPT	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
RMN- ¹ H	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
R	- Fração retida
S	- Fração sobrenadante
T	- Substrato colonizado e triturado
TFA	- Ácido trifluoroacético
TG	- Tubo germinativo
ufc	- Unidades formadoras de colônia
v/v	- Volume por volume
Yx/s	- Rendimento de biomassa a partir da glucose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 AGENTE DE BIOCONTROLE <i>Clonostachys rosea</i>	22
2.1.1 Morfologia, taxonomia e ecologia.....	22
2.1.2 Um promissor agente de biocontrole de amplo espectro de ação.....	24
2.1.3 <i>Clonostachys rosea</i> : um potente antagonista para <i>Botrytis cinerea</i>	25
2.1.4 Mofo cinzento em morangueiros – um caso especial.....	26
2.2 DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO PARA CONTROLE BIOLÓGICO.....	29
2.2.1 Otimização da produção de esporos de <i>Clonostachys rosea</i>	31
2.2.2 Formulação e armazenamento dos esporos de <i>Clonostachys rosea</i>	34
2.2.2.1 Germinação de esporos após secagem.....	34
2.2.2.2 Vida de prateleira ou armazenamento.....	35
2.2.2.3 Controle de qualidade.....	36
2.2.2.4 Técnicas utilizadas para a formulação de <i>Clonostachys rosea</i>	37
2.3 MECANISMOS DE AÇÃO DO FUNGO <i>Clonostachys rosea</i> NO PROCESSO DE CONTROLE BIOLÓGICO.....	42
2.4 POLISSACARÍDEOS DA FAMÍLIA BIONECTRIACEAE.....	46
3 JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E ESTRATÉGIA.....	48
3.1 FORMULAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i>	48
3.2 POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA E EXOPOLISSACARÍDEOS DE <i>Clonostachys rosea</i>	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS.....	53
4.2 PREPARO DO INÓCULO DE <i>Clonostachys rosea</i>	53

4.3 DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO PARA OS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i>	54
4.3.1 Preparo e inoculação do meio de cultura com <i>Clonostachys rosea</i> – Metodologia geral.....	54
4.3.2 Teste de secagem lenta.....	55
4.3.3 Extração de esporos dos grãos de arroz colonizados por <i>Clonostachys rosea</i>	56
4.3.4 Teste de germinação dos esporos – Viabilidade.....	56
4.3.4.1 Sistema de deposição de gota sobre lâmina.....	56
4.3.4.2 Testes preliminares.....	58
4.3.4.3 Teste de viabilidade dos esporos do produto comercial Clonostat PM®.....	58
4.3.5 Teste de eficácia dos esporos de <i>Clonostachys rosea</i> por titulação.....	59
4.3.6 Teste de eficácia dos esporos de <i>Clonostachys rosea</i> em maçãs.....	61
4.3.7 Experimento completo de formulação dos esporos de <i>Clonostachys rosea</i>	63
4.3.7.1 Fermentações em Diferentes Condições de Secagem.....	63
4.3.7.2 Formulações.....	65
4.3.7.3 Armazenamento.....	66
4.3.7.4 Amostragem.....	66
4.4 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA E DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE <i>Clonostachys rosea</i>	67
4.4.1 Fermentação líquida de superfície do fungo <i>Clonostachys rosea</i>	67
4.4.2 Análises das fermentações de <i>Clonostachys rosea</i> feitas em frascos de erlenmeyer de 500 mL.....	68
4.4.3 Extração aquosa dos polissacarídeos da biomassa e purificação dos polissacarídeos da biomassa e dos exopolissacarídeos.....	68
4.4.4 Extração alcalina e purificação dos polissacarídeos da biomassa.....	71
4.4.5 Análise estrutural dos polissacarídeos.....	71
4.4.5.1 Composição monossacarídica.....	71

4.4.5.2 Determinação de homogeneidade.....	72
4.4.5.3 Análise de metilação.....	73
4.4.5.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
5.1 DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO PARA OS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i>	74
5.1.1 Teste de germinação de esporos de <i>Clonostachys rosea</i> para avaliar a viabilidade de forma quantitativa.....	76
5.1.2 Teste de eficácia dos esporos em placas.....	79
5.1.3 Teste de eficácia dos esporos em maçãs.....	81
5.1.4 Teste de secagem lenta.....	82
5.1.5 Experimento completo de formulação dos esporos de <i>Clonostachys rosea</i> – Planejamento.....	85
5.1.6 Experimento completo de formulação dos esporos de <i>Clonostachys rosea</i> : Avaliação da viabilidade dos esporos.....	86
5.1.6.1 Comparação entre as fermentações FES-1, FES-2 e FES-3.....	86
5.1.6.2 Efeitos dos processos de formulação e temperaturas de armazenamento - Comparação entre as fermentações FES-1 e FES-3.....	89
5.1.7 Experimento completo de formulação dos esporos de <i>Clonostachys rosea</i> - Avaliação da eficácia dos esporos.....	91
5.1.8 Avaliação do experimento completo de formulação dos esporos de <i>Clonostachys rosea</i>	97
5.2 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS DO MICÉLIO E EXOPOLISSACARÍDEOS DE <i>Clonostachys rosea</i>	99
5.2.1 Fermentação líquida de superfície de <i>Clonostachys rosea</i> e caracterização inicial dos polissacarídeos.....	99
5.2.2 Fermentação líquida de superfície de <i>C. rosea</i> em uma concentração inicial de glucose mais elevada.....	104
5.2.3 Estudos estruturais do polissacarídeo da biomassa e do EPS de <i>Clonostachys rosea</i>	108

5.2.4 Análise dos resultados obtidos para os polissacarídeos de <i>Clonostachys rosea</i>	113
5.2.4.1 Origem do EPS de <i>Clonostachys rosea</i>	113
5.2.4.2 Natureza do Polissacarídeo da Parede Celular de <i>Clonostachys rosea</i>	115
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
6.1 ESTUDOS DE FORMULAÇÃO DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i>	117
6.2 POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA E EXOPOLISSACARÍDEOS DE <i>Clonostachys rosea</i>	119
REFERÊNCIAS	120
APÊNDICES	132
ANEXOS	140

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Clonostachys rosea* atua no controle biológico do mofo cinzento, doença causada pelo fungo *Botrytis cinerea* que atinge muitas culturas, sendo uma das doenças mais importantes no morangueiro. Viccini (2004) e Viccini *et al.* (2007) otimizaram as condições para a produção de esporos de *C. rosea* em fermentação em estado sólido (FES), utilizando grãos como substratos.

O presente trabalho aborda dois temas distintos. Primeiro, dá continuidade aos estudos sobre a produção de esporos de *C. rosea* para utilização no biocontrole. Especificamente, enfoca o desenvolvimento de uma formulação para os esporos de *C. rosea*, visando desenvolver um produto para controle biológico, e o estabelecimento de condições de armazenamento deste produto que promovam a manutenção da viabilidade e da eficácia desses esporos. Em segundo lugar, apresenta o primeiro estudo sobre os carboidratos produzidos por *C. rosea*. A motivação inicial dessa parte do trabalho deve-se ao crescente interesse em polissacarídeos fúngicos devido às atividades biológicas comprovadas e as aplicações bem sucedidas nas áreas industrial e médica (VANHOOREN; VANDAME, 1999; WASSER, 2002; SLAMENOVÁ *et al.*, 2003; SHINGEL, 2004; SILVA *et al.*, 2006).

Entretanto, durante o processo de purificação, notou-se que os polissacarídeos selecionados para caracterização apresentavam características compatíveis com galactomananas encontradas comumente na parede celular fúngica. Embora aplicações biotecnológicas não sejam relatadas na literatura para esses polissacarídeos, sua caracterização auxiliou no esclarecimento do comportamento fisiológico de *C. rosea* durante o processo de fermentação líquida e, além disso, apresentou relação com o mecanismo de ação por micoparasitismo, extensamente utilizado por esse fungo no controle biológico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão trata de três pontos principais: primeiro, descreve o microrganismo em estudo neste trabalho, o agente de biocontrole *Clonostachys rosea*; na sequência, apresenta o processo de desenvolvimento de um produto de biocontrole baseado neste fungo. Por fim, descreve, de forma sucinta, os mecanismos de ação desse agente de biocontrole e relata a importância dos carboidratos presentes na parede celular durante o mecanismo de ação por micoparasitismo.

2.1 AGENTE DE BIOCONTROLE *Clonostachys rosea*

2.1.1 Morfologia, taxonomia e ecologia

O fungo *C. rosea* é um hifomiceto que produz conídios unicelulares em duas formas distintas, penicilado e verticilado (Fig. 1). As colônias do fungo em ágar são geralmente esbranquiçadas, laranjadas ou salmão. O fungo *C. rosea* é a forma anamorfa (fase assexuada) de *Nectria ochroleuca* (Schwein.) Berk, um ascomiceto da ordem Hypocreales (SAMUELS¹, 1976, citado por SUTTON *et al.*, 1997). Domsch² *et al.* (1980, citado por Sutton *et al.*, 1997) propuseram que ex-*Gliocladium roseum* se tornasse o gênero *Clonostachys*. Hoje é classificado como *Clonostachys rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert e W. Gams [*Gliocladium roseum* Bainier, teleomorph, *Bionectria ochroleuca* (Schw.) Schroers and Samuels] (SCHROERS *et al.*, 1999).

¹ SAMUELS, G.H. A revision of the fungi formerly classified as *Nectria*, subgenus *Hyphonectria*. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v.26 (1), p.1-126, 1976.

² DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. Academic Press, London, 1980.

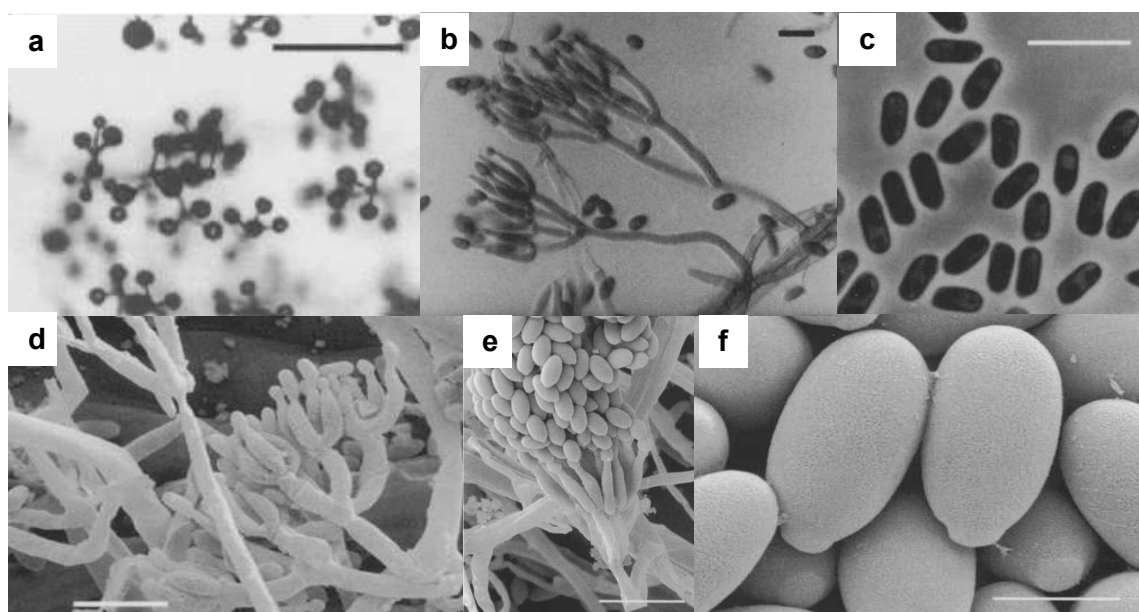


FIGURA 1 – *Clonostachys rosea*

(a) Conidióforos verticilados (escala = 100 μm); (b) Conidióforos penicilados (escala = 10 μm); (c) Esporos (escala = 10 μm); (d) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de conidióforos penicilados (escala = 10 μm); (e) MEV de uma massa de esporos em um conidióforo penicilado (escala = 15 μm) e (f) MEV de esporos (escala = 3 μm)
 FONTE: (OKUDA *et al.*, 2000)

O fungo *C. rosea* é encontrado em diversas regiões do mundo: tropicais, temperadas, subárticas e até desérticas. Foi descrito em culturas, campo, matas, florestas, água doce e solos litorâneos, particularmente em locais com pH variando entre neutro e alcalino. Intrigantemente, *C. rosea* é conhecido por colonizar raízes, hastes, vagens, e sementes de soja, raízes de trevo vermelho, folhas de morango e framboesa, sem produzir sintomas. Além disso, foi relatado que o fungo *C. rosea* poderia ser patógeno de maçãs, tubérculos de batata, plântulas de coníferas, violeta-persa e feijões de fava, mas estes estudos foram inconclusivos, uma vez que não foram feitos estudos de isolamento e reinoculação do fungo (HUBER³; FINLEY,

³ AL-HAMDANY, M.A.; SALIH, M.M. Wilt causing fungi on broad bean. **Indian Phytopathology**, v.39, p.620-622, 1986. ARIE, T.; NAMBA, S.; YAMASHITA, S.; DOI, Y.; KIJIMA, T. Stem blight, a new disease of *Exacum* caused by *Nectria gliocladioides* Smalley et Hansen. **Annals of Phytopathological Society of Japan**, v.53, p.570-575, 1987. HANSO, M.; KAROLES, K. Some agents of damping-off in conifer seedlings in Estonian forest nurseries and associated microfungi. **Metsanduslikud Uurimused**, v.16, p.120-134, 1980. HUBER, D.M.; FINLEY A.M. *Gliocladium roseum*, a causal agent in the bean root rot complex in Idaho. **Plant Disease Report**, v.43, p.626-628, 1959. IBNU, Z.; SUPRIANA, N.; Inventory of diseases at three *Pinus merkusii* nurseries in North Sumatra. **Bulletin Penelitian Kehutanan**, v.3, p.37-44, 1987. THERON, D.J.; HOLZ, G. Dry rot of potatoes caused by *Gliocladium roseum*. **Plant Pathology**, v.40, p.302-305, 1991.

1959; HANSO; KAROLES, 1980; AL-HAMDANY; SALIH, 1986; ARIE *et al.*, 1987; IBNU; SUPRIANA, 1987; THERON; HOLZ, 1991, citado por SUTTON *et al.*, 1997). O estado teleomorfo (fase sexuada) de *C. rosea*, *N. ochroleuca*, é encontrado na maioria das vezes nos galhos de árvores recém mortas, mas também sobre tecidos jovens de plantas herbáceas e fungos.

2.1.2 Um promissor agente de biocontrole de amplo espectro de ação

O fungo filamentoso *C. rosea* surgiu como um eficaz e versátil antagonista de um amplo espectro de fungos fitopatogênicos em estudos no final da década de 1980. Ele gerou grande interesse entre produtores e pesquisadores nos diversos países onde foi encontrado, entre eles o Brasil (PENG; SUTTON; KEVAN, 1992; SUTTON *et al.*, 1997; SURGEONER, 1998).

Ele tem sido reportado como um agente de controle biológico contra várias espécies de *Botrytis* (BARNETT; LILLY, 1962; JAMES; SUTTON, 1996) com destaque para o fungo causador do mofo cinzento, *Botrytis cinerea* (PENG; SUTTON, 1991; SUTTON; PENG, 1993; SUTTON *et al.*, 1997; VALDEBENITO-SANHUENZA *et al.*, 1997; YU; SUTTON, 1997; SURGEONER, 1998; MORANDI *et al.*, 2000, 2003, 2006; LI *et al.*, 2002, 2004; NOBRE *et al.*, 2005; COTA *et al.*, 2008a, 2008b).

Sua eficácia também foi comprovada contra os seguintes fungos:

- *Didymella rabiei*: agente causador da ferrugem Ascochyta de grãos-de-bico (DUGAN *et al.*, 2005),
- *Alternaria radicina* e *A. dauci*: patógenos de sementes de cenoura que causam *damping-off* (ou tombamento) em sementes e plântulas, isto é, causam a morte das sementes durante a fase de germinação ou na fase de plântula. Além disso, *A. dauci* causa ferrugem nas folhas das cenouras e *A. radicina* causa podridão negra nas cenouras armazenadas (JENSEN *et al.*, 2004),
- *Verticillium dahliae* Kleb: agente causador da murcha da batata e de outras culturas, podendo persistir no solo por mais de 10 anos na

ausência de batata. Causa graves prejuízos em todas as regiões produtoras de batata nos Estados Unidos (KEINATH *et al.*, 1991),

- *Ciboria batschiana*: patógeno que causa redução no tempo de armazenamento das bolotas do carvalho-vermelho (*Quercus robur* L.), uma madeira muito utilizada na Dinamarca (KNUDSEN *et al.*, 2004), e
- *Pythium tracheiphilum*: agente causador de podridão nas folhas e nas cabeças de couves chinesas, resultando em mais de 50% de perdas nas colheitas (MØLLER *et al.*, 2003).

Ele também foi utilizado com sucesso contra o “*pea root rot complex*”, um complexo que compreende os fungos *Alternaria alternata*, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Mycosphaerella pinodes*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, e que é considerado como o fator limitante da produção de ervilhas (*Pisum sativum* L) no Canadá. Estes patógenos causam diversos sintomas, com destaque para a redução da germinação das sementes, a podridão das raízes e dos pés, a ferrugem das plântulas e a murcha das plantas (XUE, 2003).

O fungo *C. rosea* não atua somente contra outros fungos; estudos recentes comprovam sua atuação como patógeno de insetos *Oncometopia tucumana* e *Sonesimia grossa* (TOLEDO *et al.*, 2006) e como parasita facultativo de nematóides patogênicos (ZHAO *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2006).

2.1.3 *Clonostachys rosea*: um potente antagonista para *Botrytis cinerea*

A atuação de *C. rosea* como agente de biocontrole de *B. cinerea*, causador do mofo cinzento, merece um destaque especial. Isto se deve não somente a eficácia de *C. rosea* mas também à importância econômica dos danos que *B. cinerea* causa em diversas culturas. A eficácia de controle do mofo cinzento por *C. rosea* já foi comprovada em diversas culturas, como cultivos em estufas de begônia, ciclame, gerânio, gérbera, hortênsia, violeta persa (*Exacum*), poinsettia, rosa, pepino, pimentão e tomate, e em morango e framboesa cultivados no campo (SUTTON *et al.*, 1997).

Além disso, *C. rosea* possui vantagens como: (1) produção de inóculo abundante; (2) esporos aderentes que facilitam manuseio enquanto minimizam riscos de alergia associada à exposição dos trabalhadores ao produto; e (3) ausência de risco ecológico devido a sua ampla distribuição natural nas plantas e no solo (SURGEONER, 1998).

Por outro lado, o controle do mofo cinzento através do uso de produtos químicos tem se tornado muito difícil. Isso ocorre porque o número de produtos liberados para o controle de *B. cinerea* é pequeno, o que favorece o desenvolvimento de estirpes resistentes (FOKKEMA, 1993; SALIGKARIAS; GRAVANIS; EPTON, 2002). Além disso, a aplicação constante de fungicidas é dificultada devido ao período de carência (período de tempo obrigatório entre a aplicação do produto e a colheita). Somando a isso o aumento da preocupação dos consumidores no que diz respeito ao uso de agrotóxicos (BERRIE, 2000; SALIGKARIAS; GRAVANIS; EPTON, 2002), a resultante implica na necessidade de explorar estratégias alternativas para o controle (BERRIE, 2000), que justifica o interesse no uso de agentes de biocontrole como *C. rosea*.

2.1.4 Mofo cinzento em morangueiros – um caso especial

No morangueiro, a podridão do fruto causada por *Botrytis cinerea* é uma das doenças mais importantes, reduzindo a produtividade e a qualidade dos frutos e requerendo freqüentes aplicações de fungicidas para manter o controle (BERRIE, 2000; KOVACH; PETZOLDT; HARMAN, 2000; LEGARD; MERTELY, 2000; BOFF *et al.*, 2003). Ela ocorre em todas as regiões do mundo onde se cultiva o morangueiro e sempre causa grandes prejuízos, podendo causar perdas de 50% ou mais na produção (SURGEONER, 1998).

Apesar de atacar todas as partes do morangueiro que estão acima do solo, *B. cinerea* é mais importante como causador da podridão do fruto, em pré e pós-colheita. O fungo passa o inverno como micélio sobre as folhas mortas, frutos mumificados e escombros no canteiro e, na primavera, esporula, dando origem a esporos durante períodos de alta umidade, os quais são carregados pelo vento e pela água da chuva (BERRIE, 2000).

A principal via pela qual o fungo infecta os frutos são as flores. Elas são susceptíveis a infecção após a abertura (BOFF *et al.*, 2003). O patógeno permanece quiescente no receptáculo floral até o amadurecimento do fruto, podendo causar podridão antes ou após a colheita (BOFF *et al.*, 2003), sendo que a podridão se desenvolve rapidamente quando os frutos começam a amadurecer (BERRIE, 2000). Além da sua importância no estabelecimento de infecções latentes, as partes florais do morango também podem ser fontes de inóculo para infecções diretas nos frutos que se iniciam a partir de pétalas mortas aderidas à superfície dos frutos, ou presas entre o fruto e o cálice (BOFF *et al.*, 2003).

Assim, para controlar esta doença, são recomendadas aplicações de fungicidas para proteger principalmente as flores. No entanto, as flores desenvolvem-se durante longos períodos, os quais coincidem com a formação e maturação dos frutos (VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 1997). Esse fato dificulta o cumprimento do período de carência dos produtos químicos, visto que a colheita é feita ao mesmo tempo em que a aplicação dos fungicidas, o que explica a presença constante de resíduos químicos nos frutos.

Para substituir o controle químico de *B. cinerea* no morangueiro, tem sido proposto o uso de *C. rosea* como agente de biocontrole. Este fungo é considerado seguro por fazer parte da flora natural que coloniza folhas e partes florais do morangueiro. Além disso, tem mostrado excelente proteção das plantas e redução de perdas causadas por *B. cinerea* em vários cultivares, em condições controladas e de campo (SUTTON⁴, 1995, citado por VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 1997).

Em pesquisas feitas em folhas unidas ou não unidas a planta, pétalas e estames de morango, o fungo *C. rosea* suprimiu regularmente a incidência de *B. cinerea* em mais de 98%. Seu desempenho foi tão bom ou melhor que outros microrganismos, como *Trichoderma viride*, *Alternaria alternata*, *Myrothecium verrucaria* e *Penicillium* spp. e um fungicida padrão (Captan) (SUTTON *et al.*, 1997). Nota-se ainda que a colonização das pétalas por *B. cinerea* pode ser prevenida ou reduzida pela ação de *C. rosea*, o que indica que este agente de biocontrole pode proteger as pétalas contra *B. cinerea* durante o resto do período produtivo. Isto seria uma grande vantagem, visto que as aplicações de fungicida oferecem proteção somente por um período limitado (BOFF *et al.*, 2003).

⁴ SUTTON, J.C. Evaluation of micro-organisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. In: **Advances in Plant Pathology**, v.2, New York, Academic Press, p. 173-190, 1995.

Em testes para comparar a eficiência de *C. rosea* e do fungicida Captan® na proteção das flores do morango, o fungo suprimiu a incidência de *B. cinerea* em estames de 93% para 79% e em frutos de 76% para 48%, uma performance igual ou melhor que o fungicida. Em outro estudo, *C. rosea* foi mais eficaz que Captan contra *B. cinerea* em frutos de oito diferentes cultivares de morango. Os tratamentos foram aplicados em vasos ao amanhecer e antes do anoitecer, baseados na conjectura que orvalho e escuro podem facilitar a sobrevivência e a atividade dos organismos de biocontrole (SUTTON *et al.*, 1997).

Aplicações semanais de *C. rosea* também proporcionaram um bom controle de *B. cinerea* em morangueiros da variedade Chandler cultivados em estufas num clima extremamente úmido nas montanhas da Serra Gaúcha no sul do Brasil. Perdas de frutos durante a colheita foram de 27% em morangos tratados com *C. rosea* comparado com 36% obtidos por um programa de aplicações mensais de uma seqüência de fungicidas (Benomil®, Captan® e Vinclozolina®). Nas avaliações feitas no quarto ou quinto dia após a colheita, as perdas foram de 52% com o tratamento com *C. rosea* e de 64% para o tratamento com os fungicidas (SUTTON *et al.*, 1997; VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 1997).

C. rosea atua efetivamente contra *B. cinerea* não somente nas flores e frutos, mas também nas folhas do morangueiro, a principal fonte de inóculo do patógeno nessa cultura (SUTTON *et al.*, 1997). *C. rosea* suprimiu a produção de esporos de *B. cinerea* nas folhas de 90 a 100% e foi sempre mais eficaz que Chlorothalonil® (um fungicida de excepcional eficácia contra *B. cinerea* nas folhas do morangueiro), em 6 testes de campo em Ontário, Canadá. Nas parcelas tratadas com *C. rosea*, constatou-se o menor número de frutos afetados na maioria das avaliações. Os resultados obtidos confirmam o potencial desse microrganismo para o controle de *B. cinerea* em morangueiros (FOKKEMA, 1993; SUTTON *et al.*, 1997).

2.2 DESENVOLVIMENTO DE UM PRODUTO PARA CONTROLE BIOLÓGICO

A produção de microrganismos selecionados para uso agropecuário não é uma prática muito difundida no Brasil. Esta situação se deve à falta de aperfeiçoamento nas técnicas utilizadas no processo de produção, aos inadequados graus de pureza dos produtos finais e aos elevados custos de produção. Esses fatos inviabilizam os investimentos de empresas privadas nos processos e, por sua vez, o setor agropecuário se priva dos benefícios destes microrganismos.

Entre os pontos cruciais para o uso de produtos baseados em microrganismos na agropecuária, destacam-se (1) produção, (2) formulação, (3) armazenamento e (4) aplicação. Assim, um programa de pesquisa para desenvolver um agente de controle biológico envolve diferentes fases, como: obtenção de microrganismos; desenvolvimento da produção em meios de cultivo adequados; otimização e ampliação da escala do processo; estudos de recuperação e concentração do produto; estudos de formulação e aplicação em campo; registro e comercialização. Estas fases são apresentadas de maneira simplificada na Figura 2.

O controle biológico tem representantes de grande sucesso, como *Bacillus thuringiensis*, que ocupa 97% do mercado mundial de biopesticidas (BRAR *et al.*, 2006) e *Trichoderma* spp. Entretanto, o nível do sucesso financeiro conseguido por esses produtos não foi repetido para a maioria dos biopesticidas registrados. Problemas de estabilidade dos microrganismos durante os processos de fermentação e formulação têm impedido a comercialização de muitos produtos de biocontrole (HYNES; BOYETCHKO, 2006). Muitas vezes organismos promissores foram utilizados em formulações testadas com sucesso em casas de vegetação, onde há um ambiente controlado, porém, quando estas formulações foram testadas a campo, elas não repetiram a eficácia. Em outros casos, os microrganismos formulados simplesmente não foram eficazes no campo, as formulações foram consideradas inadequadas e as pesquisas abandonadas.

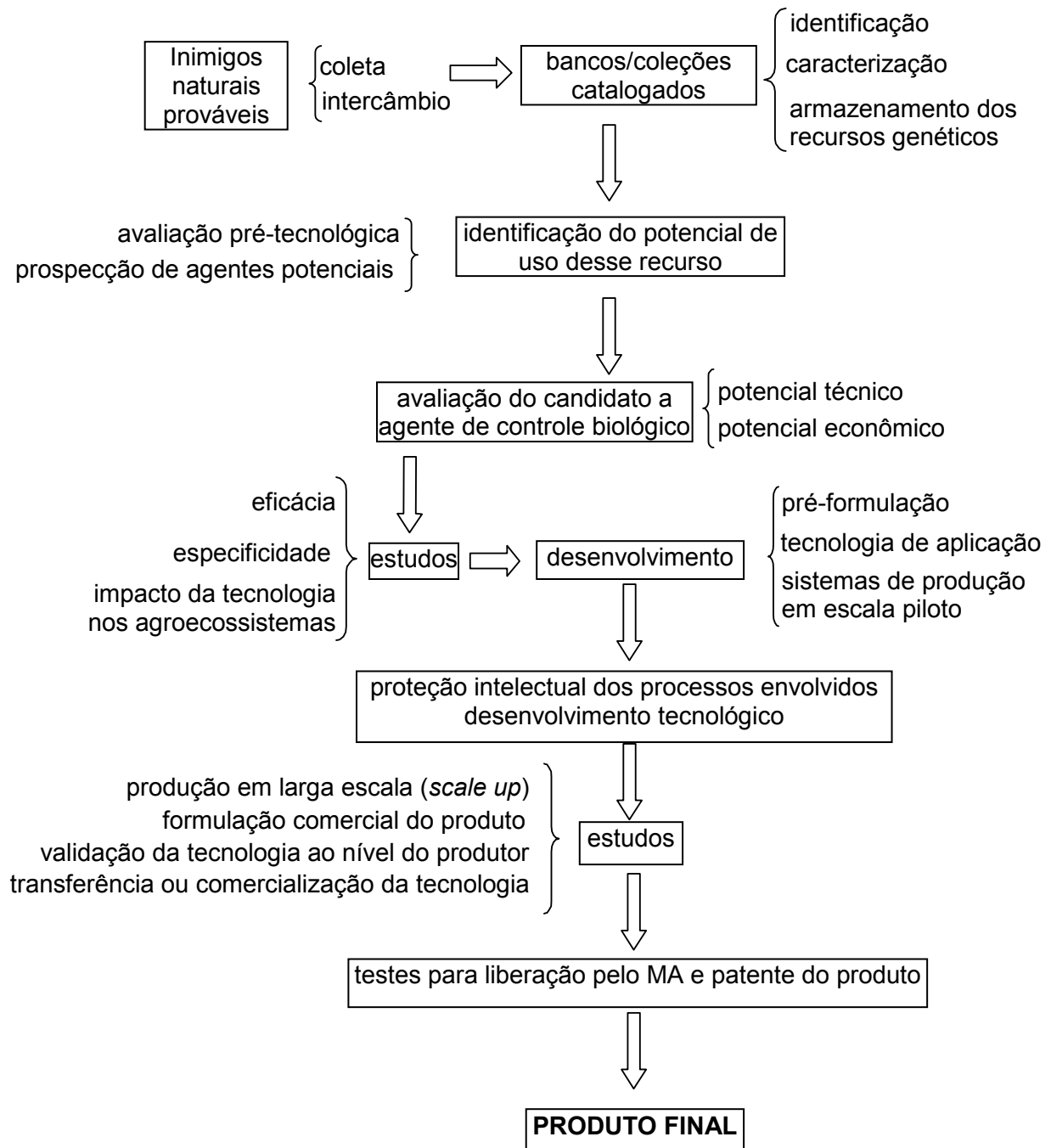


FIGURA 2 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DE UM PROGRAMA DE PESQUISA PARA DESENVOLVER UM AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO

FONTE: (VICCINI, 2004)

Nesta conjectura, o desenvolvimento de uma formulação correta e adequada tem quatro pontos-chave para alcançar o sucesso: (1) garantir a estabilidade do agente de biocontrole durante o processo de formulação, de armazenamento e de distribuição; (2) facilitar o manuseio e a aplicação do produto; (3) proteger o agente de fatores ambientais adversos; e (4) aumentar a atividade de biocontrole do microrganismo em campo (BRAR *et al.*, 2006).

As formulações são geralmente compostas por: (1) um ingrediente ativo, isto é, microrganismos, hifas ou esporos, (2) carreadores, frequentemente materiais inertes usados como bases na formulação e para auxiliar na distribuição do ingrediente ativo e, (3) adjuvantes, compostos que auxiliam na função do ingrediente ativo através de proteção contra radiação ultravioleta, chuvas fortes e dessecação, reterendo a umidade ou promovendo a propagação e a dispersão do biopesticida (HYNES; BOYETCHKO, 2006).

Na seqüência são apresentados os principais resultados disponíveis na literatura sobre trabalhos que visam desenvolver um agente de controle biológico para aplicação comercial com base no fungo *C. rosea*.

2.2.1 Otimização da produção de esporos de *Clonostachys rosea*

Devido à eficácia de *C. rosea* como agente de biocontrole do fungo *B. cinerea*, sua produção em grande escala é desejada. A etapa de produção do microrganismo é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de um produto biológico e inclui a seleção do meio, do tipo de processo utilizado para a produção – fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação líquida (FL) – e das condições ótimas para o cultivo (temperatura, umidade, atividade de água, aeração e agitação, entre outras).

O fungo *C. rosea* produz dois tipos de propágulo: hifas e esporos assexuados. Como as hifas não toleram condições ambientais adversas e não sobrevivem a algumas etapas que podem ser empregadas nos processos de formulação, como a secagem rápida, todas as pesquisas com intuito de desenvolver um produto de biocontrole de *C. rosea* se concentram no uso de seus esporos como ingrediente ativo. Assim, um agente de controle biológico baseado em *C. rosea*

somente pode ser uma alternativa aos químicos se seus esporos ativos puderem ser produzidos em larga escala e formulados de maneira reprodutível, eficaz e de baixo custo.

O fungo *C. rosea* pode produzir esporos abundantes tanto em FES quanto em FL (FRIER *et al.*, 1999). A produção dos esporos sobre grãos, através de técnicas de FES, fornece vantagens como baixo custo, praticidade e fácil execução (VICCINI *et al.*, 2007). Outra vantagem é que a FES fornece esporos mais virulentos e mais resistentes às condições extremas do meio ambiente (MORIN, 1992).

Este fato foi descrito para *Trichoderma harzianum* e para *Trichoderma* spp., cujos esporos produzidos por FES sobreviveram melhor em temperatura ambiente e a 15 °C, respectivamente, do que os esporos produzidos por FL (MUÑOZ *et al.*, 1995; CLIQUET; SCHEFFER, 1997). O estudo de Muñoz *et al.* (1995), que comparou as propriedades dos esporos de *T. harzianum* produzidos nos dois sistemas, sugeriu explicações para esta diferença. Inicialmente, os esporos produzidos por FES formavam aglomerados recobertos por uma matriz extracelular e possuíam um citoplasma denso, com poucas organelas. Ao contrário, os esporos produzidos por FL eram 35% maiores, não formavam agregados, não possuíam matriz extracelular e possuíam citoplasma menos denso com grandes quantidades de vacúolos e mitocôndrias, características que são encontradas em células metabolicamente ativas, como esporos em processo de germinação. Foram observadas outras diferenças importantes. Primeiro, os esporos produzidos por FES possuíam uma parede celular com espessura duas vezes maior que a dos esporos de FL. Segundo, os esporos produzidos por FES apresentaram uma maior hidrofobicidade, que é um parâmetro chave no estabelecimento do microrganismo no filoplano, e uma maior resistência a condições de estresse, como umidade relativa elevada e radiações UV.

Semelhante ao que foi relatado para *T. harzianum*, os esporos de *C. rosea* produzidos por FES também apresentaram maior sobrevivência em comparação aos esporos produzidos por FL (JENSEN; KNUDSEN; JENSEN, 2002).

A eficácia de agentes de controle biológico também é afetada pelas condições de produção (substrato, condições de luz, temperatura, agitação e umidade). Entretanto, na literatura existem poucas informações sobre as condições ideais de produção de *C. rosea*. A maioria dos trabalhos das décadas de 1980 e 1990 relata apenas testes de campo que foram realizados para comprovar a eficácia

do agente, sem estudar o processo de produção em si. Devido a esta lacuna, recentemente o fungo *C. rosea* tem sido foco de estudos para viabilizar e otimizar sua produção (KRAUSS *et al.*, 2002; VICCINI, 2004; VICCINI *et al.*, 2007).

No trabalho de Viccini (2004) e Viccini *et al.* (2007), *C. rosea* foi cultivado em FES sobre arroz branco tipo agulhinha em frascos de erlenmeyer. Várias condições de cultivo foram otimizadas. O melhor teor inicial de água foi de 7,5 mL para cada 10 g de arroz e a produção de esporos foi favorecida quando os frascos foram fechados com papel higiênico em vez de um tampão de algodão. Este modo de fechamento proporcionou uma secagem do arroz durante o cultivo que estimulou a esporulação do fungo. Também foi testado o efeito de diferentes frequências de agitação manual dos frascos. A maior produção de esporos foi obtida quando os erlenmeyers foram agitados a cada 15 dias. Produções ligeiramente mais baixas foram observadas nos erlenmeyers que foram agitados a cada 7 dias e naqueles que não foram agitados durante a fermentação. A concentração inicial de inóculo, que variou de 9×10^3 até 6×10^6 esporos g^{-1} de substrato seco, teve relativamente pouca influência sobre a produção de esporos, uma vez que o rendimento final de esporos variou somente 33%. Após a otimização das condições de cultivo, foi obtido um rendimento máximo de $3,36 \times 10^9$ esporos g^{-1} de substrato em arroz após 60 dias de FES. Entretanto, a produção de esporos obtida a partir do 15º dia já era similar à produção máxima final.

Neste ponto, é importante ressaltar que, além das condições de cultivo, o período de fermentação também pode influenciar a viabilidade e a eficácia dos esporos. Moore *et al.* (1996) comprovou que uma FES por um período prolongado afetou a viabilidade dos esporos de *Metarhizium flavoviride*, sendo que a sobrevivência dos esporos obtidos após 24 dias de cultivo foi maior do que a de esporos obtidos após 12 dias de cultivo, em temperaturas entre 28-32 °C. Para *C. rosea*, esporos produzidos em FES de 20 dias de duração apresentaram maior viabilidade que esporos produzidos em FES de 12 dias de duração (JENSEN; KNUDSEN; JENSEN, 2002). Além disso, há relatos na literatura que períodos de cultivo mais longos aumentam a resistência aos raios ultravioleta, a hidrofobicidade e a espessura da parede de esporos de vários fungos, características que são muito

importantes para a sobrevivência dos esporos (MUÑOZ *et al.*, 1995; MOORE⁵ *et al.*, 1993, citado por JENSEN; KNUDSEN; JENSEN, 2002). Assim, a definição do melhor tempo de cultivo não deve levar em conta apenas a maior produção de esporos mas, principalmente, a produção de esporos fisiologicamente “maduros” e com alta viabilidade.

2.2.2 Formulação e armazenamento dos esporos de *Clonostachys rosea*

Muitos trabalhos têm sido escritos com o tema “produção em massa” de esporos para diversos fungos. A maioria descreve experimentos para otimizar a produção de esporos de um dado isolado em um substrato específico, mas raramente incluem pesquisas sobre a formulação destes esporos (JENKINS, 1998).

A formulação é a maneira de apresentar o ingrediente ativo em uma forma física mais efetiva com respeito à atividade biológica, estocagem e aplicação. O material a ser utilizado nas formulações (inerte ou aditivo) não deve ser tóxico, deve possuir uniformidade e ser de fácil manuseio. Além disso, deve manter ou aumentar a sobrevivência do ingrediente ativo e facilitar a aplicação do produto final.

Para avaliar uma formulação devem ser analisadas as seguintes características: (1) germinação dos esporos após secagem, (2) vida de prateleira ou armazenamento e (3) reprodutibilidade. Estes pontos serão abordados nas subseções seguintes.

2.2.2.1 Germinação de esporos após secagem

A secagem é uma etapa presente em grande parte dos processos de formulação. Essa etapa visa minimizar a proliferação de eventuais contaminantes e assim, manter a qualidade do produto final. Entretanto, a secagem pode causar significativa redução tanto na proporção quanto na velocidade de germinação dos esporos, em comparação com esporos recém-coletados.

⁵ MOORE, D.; BRIDGE, P.D.; HIGGINS, P.M.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Ultraviolet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annals of Applied Biology**, v.122, p.605-616, 1993.

Existem dois relatos um pouco contraditórios na literatura sobre o efeito da secagem na sobrevivência e na germinação de esporos de *C. rosea*. De acordo com Frier *et al.* (1999), ao contrário da maioria dos fungos utilizados para biocontrole, ambos os esporos de *C. rosea* recém coletados e aqueles submetidos à secagem iniciam o processo de germinação dentro de 4 horas. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que esporos de *C. rosea* submetidos a processos de secagem germinam mais lentamente que esporos recém coletados (JENSEN⁶ *et al.*, 1996, citado por JENSEN *et al.*, 2007).

2.2.2.2 Vida de prateleira ou armazenamento

O sucesso comercial de um agente de controle biológico depende de uma vida de prateleira adequada, isto é, da manutenção da viabilidade e da eficácia dos esporos ao longo do tempo. De acordo com Frier *et al.* (1999), um mínimo de 1 ano de vida de prateleira, preferencialmente sem refrigeração, é recomendado para um produto biológico.

O trabalho de Frier *et al.* (1999) é o único relato, disponível na literatura, sobre a formulação de esporos de *C. rosea* com avaliação da eficácia e da viabilidade ao longo do tempo. Seus estudos visaram à aplicação de formulações dos esporos do isolado IK726 de *C. rosea* no biocontrole em sementes de cereais. Nas formulações padrão e otimizada com turfa "sphagnum peat" e preparações com argila dos esporos de *C. rosea*, armazenadas a 4 °C, a viabilidade dos esporos foi independente dos métodos de produção e formulação testados. Além disso, apresentaram um biocontrole eficiente de *Fusarium culmorum* independente do período de armazenamento (de poucas semanas até mais de 1 ano) nesta temperatura. Entretanto, no armazenamento a 20 °C, o método de formulação foi decisivo para um armazenamento eficiente, visto que somente a formulação otimizada com turfa manteve a viabilidade do agente de biocontrole por aproximadamente 1 ano e a eficácia elevada por 10 meses. Entretanto, Frier *et al.*

⁶ JENSEN, B.; KNUDSEN, I.M.B.; JENSEN, D.F.; HOCKENHULL, J. Development of a formulation of *Gliocladium roseum* for biological seed treatment. In: **Biological and integrated control of root diseases in soilless cultures**. (Ed. C Alabouvette), IOBC/wprs Bulletin 19, p.164-169, 1996.

(1999) somente relatou os resultados em termos gerais; não apresentou os protocolos utilizados nem os dados obtidos para cada teste. Portanto, seu trabalho não fornece uma base adequada para o desenvolvimento e avaliação de uma formulação de *C. rosea*.

2.2.2.3 Controle de qualidade

É necessário desenvolver um estrito procedimento de controle da qualidade e das especificações do produto que permita minimizar o efeito das variações na produção do produto. Isto é igualmente importante nas etapas subseqüentes de testes em campo e de registro de um produto. Este controle de qualidade baseia-se nas seguintes diretrizes:

- o teor de umidade do produto deve ser baixo para evitar a proliferação de organismos contaminantes, como bactérias, leveduras e outros fungos, podendo ser utilizada uma etapa de secagem antes ou logo após a formulação;
- a viabilidade dos esporos deve ser assegurada através de um teste de germinação padrão que deve ser realizado durante o processo de formulação e durante os testes de armazenamento;
- a presença de outros microrganismos contaminantes deve ser avaliada durante todos os procedimentos;
- a eficácia dos esporos deve ser assegurada através de um bioensaio que deve ser realizado durante o processo de formulação e durante os testes de armazenamento para determinar a vida de prateleira do produto (JENKINS, 1998).

2.2.2.4 Técnicas utilizadas para a formulação de *Clonostachys rosea*

Existem alguns exemplos de formulações desenvolvidas para *C. rosea* na literatura que são apresentados de forma resumida na Tabela 1. Nota-se que existem relativamente poucos estudos sobre a formulação dos esporos de *C. rosea*, e que a maioria destas formulações é destinada ao tratamento de sementes onde o produto é misturado às sementes antes de seu armazenamento. Poucos estudos focam a aplicação direta do produto formulado em plantas.

Além disso, as formulações muitas vezes são avaliadas de forma incompleta visto que, na maioria dos trabalhos, somente os resultados do produto formulado são apresentados, sem a comparação com os dados de um controle (o qual pode ser, por exemplo, o produto da fermentação sem a formulação). Assim, os possíveis danos ou benefícios que os processos de formulação podem causar na germinação e na eficácia do agente de biocontrole, em comparação com um controle, não são avaliados.

Alguns trabalhos apresentam somente testes de germinação ou somente ensaios biológicos. Isto dificulta a avaliação completa da formulação, uma vez que ela deve possuir um alto número de esporos que são, ao mesmo tempo, viáveis e eficazes, e a realização de apenas um dos testes não garante as duas características.

As características técnicas dos processos de formulação descritos na literatura também apresentam problemas: (1) alguns recipientes utilizados para o armazenamento não são factíveis e escalonáveis, como placas de petri ou tubos de vidro estéreis; (2) muitos dos carreadores utilizados apresentam custo elevado (por exemplo, talco) e, muitas vezes, são de difícil obtenção (por exemplo, turfa), o que também dificulta e aumenta os custos da formulação.

(continua)

TABELA 1 - DIFERENTES FORMULAÇÕES E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DE *Clonostachys rosea*

Aplicação	Formulação	Armazenamento	Resultados	Referência
<i>C. rosea</i> para controle de <i>B. cinerea</i> em folhas destacadas e feridas e hastes de tomate	(a) pó de esporos com talco puro (<i>Baby Powder</i> , Johnson and Johnson) (10^4 esporos g^{-1}) (b) suspensão água e surfactante (10^4 esporos mL^{-1})		Nos tecidos vegetais: esporulação de <i>C. rosea</i> foi de 72% para formulação (a) e de 80% para (b). Esporulação de <i>B. cinerea</i> foi de 12% quando aplicada formulação (a) e de 8% quando aplicada a (b).	(SUTTON <i>et al.</i> , 2002)
<i>C. rosea</i> para controle de <i>B. cinerea</i> em roseiras	Grãos de trigo colonizados foram secos com ar por 15 dias (22-25 °C), triturados e peneirados. Pó de esporos c/ 10^9 esporos / g. Formulação: 10 g de pó para 1 L de água mais surfactante (Tween 80), 10^7 esporos / mL e aplicação de 1 L de suspensão para cada 10 m ²		<i>C. rosea</i> suprimiu esporulação de <i>B. cinerea</i> em folhas e pétalas de rosa e colonizou folhas de roseira em diferentes condições de microclima.	(MORANDI <i>et al.</i> , 2003)
Avaliação da eficácia de abelhas para aplicação do agente de biocontrole <i>C. rosea</i> em flores de morangueiro para suprimir <i>B. cinerea</i>	(a) Farinha de milho, farelo usado para alimentar aves domésticas, farelo de trigo e farelo de aveia, colonizados durante 15 dias foram pulverizados em liquidificador (b) BDA (batata dextrose ágar), colonizado durante 20 dias. Triturou 60 culturas secas com 10 g de talco e 1 g de farinha de milho, a mistura foi peneirada. 5×10^8 ufc/g	Frascos de vidro por 2 semanas a 4 °C Frascos de vidro a 4-5 °C, c/ avaliação da viabilidade a cada 4 semanas	Abelhas transferiram efetivamente as formulações de <i>C. rosea</i> dos recipientes para as flores dos morangueiros e esse inóculo transferido suprimiu esporulação de <i>B. cinerea</i> em casas de vegetação e a campo. Viabilidade decaiu progressivamente com o tempo de armazenamento de 56,5% ufc viáveis (8 semanas) para 3,1% após 20 semanas de armazenamento refrigerado	(PENG; SUTTON; KEVAN, 1992)

(Continuação)

Revisão de trabalhos que comprovam que <i>C. rosea</i> é um versátil antagonista de <i>B. cinerea</i>	Grãos de trigo colonizados e formulação a partir de suspensão dos esporos com água e surfactante como Triton X-100 ou pó de esporos com talco ou outro material carreador	Vidros Mason com tampa de rosca	Viabilidade elevada por mais de um ano em temperaturas de 3-5 °C e por 3 meses a 20-23 °C	(SUTTON <i>et al.</i> , 1997)
Produção e avaliação da eficácia de esporos e da biomassa de <i>C. rosea</i> no controle de <i>B. cinerea</i> em morangueiro	Grãos de trigo colonizados (25 dias)	Tubos estéreis, fechados com rolhas de algodão, papel alumínio e parafilme. Colocados em sacos de polietileno e armazenados a 1 °C, sem luz	Avaliação semanal da viabilidade e da ocorrência de contaminantes durante 27 semanas (182 dias) A viabilidade decresceu de 87% para 62% em 7 dias, e chegou a 48% no 14º dia. Após, não ocorreu decréscimo significativo até os 161 dias de armazenamento. A germinação foi de 20% aos 168 dias e de 17% aos 182 dias.	(DALL'ONDER, 1997)
Avaliação do isolado IK726 de <i>C. rosea</i> no tratamento de sementes de cereais	(a) formulação padrão (b) formulação otimizada com turfa "sphagnum peat" ou com argila	4 °C ou 20 °C	Formulação (a) e (b) foram viáveis por mais de 1 ano a 4 °C. Formulação (a) foi viável por 2 meses a 20 °C e formulação (b) por 10 meses na mesma temperatura.	(FRIER <i>et al.</i> , 1999)
Tratamento de sementes de cereais armazenadas com formulações de <i>C. rosea</i> e esporos recém coletados	FES com turfa "sphagnum peat", farelo de trigo e água (15 : 26 : 59 v/v) inoculadas com <i>C. rosea</i> por 14 dias. Secagem com ar por 2 dias e triturado em um liquidificador	Placas de Petri de vidro a 4 °C	Sementes de cereais tratadas com formulações de <i>C. rosea</i> estocadas por 6 meses e com esporos recém coletados (controle) foram igualmente resistentes a doença causada por <i>Fusarium</i> em experimentos de campo e em câmaras de crescimento.	(JENSEN; KNUDSEN; JENSEN, 2000)

(Continuação)

Tratamento de sementes de cevada armazenadas com formulações de <i>C. rosea</i> e esporos recém coletados em diferentes temperaturas	FES com turfa "sphagnum peat", farelo de trigo e água (15 : 26 : 59 v/v) por 14 dias. Recuperação dos esporos após trituração do meio com água e filtração. Mistura com terra diatomácea (argila) (1:1,5 p/p) e secagem por 2 dias a 21 °C em câmara de fluxo laminar. Trituração em pilão.	Copos de polipropileno, 4 e 20 °C	Sobrevivência dos esporos a 4 °C foi maior do que a 20 °C. Após 16 semanas de estocagem, número de ufc/semente foi reduzido para 50% da densidade inicial para sementes estocadas a 20 °C e somente menos de 1% para sementes estocadas a 4 °C.	(JENSEN; KNUDSEN; JENSEN, 2002)
Tratamento de sementes de cenoura para controle de <i>Alternaria</i> spp.	Mesma formulação que a anterior.	4 °C até utilização	O efeito positivo do <i>biopriming</i> (combinação de condicionamento com controle biológico associado à semente) na saúde das plântulas foi mantida por 5 meses de estocagem das sementes tratadas a 4 °C e <i>C. rosea</i> sobreviveu em índices elevados nestas sementes	(JENSEN <i>et al.</i> , 2004)

ufc = unidade formadora de colônia

Embora não tenha sido encontrada informação significativa na literatura sobre o processo de formulação de *C. rosea* para aplicação direta em plantas a campo, existem dois produtos disponíveis comercialmente à base de *C. rosea*, sendo que um deles é produzido no Brasil:

- Clonosnat PM[®]: fabricado no Brasil pela empresa Natural Rural. Destina-se ao controle do fungo *B. cinerea*. Sua bula não apresenta a composição exata do produto, apenas relata o uso de amido como material inerte. Além disso, seu fabricante determina que em aplicações foliares sua utilização seja feita em conjunto com um bioativador (Clonosnat EF[®]). De acordo com a bula, esse produto é um acelerador orgânico composto por metabólitos de *C. rosea* e extratos vegetais bioativos que estimulam a ação do fungo. A descrição desses metabólitos e desses extratos vegetais não é relatada (bula apresentada no ANEXO 1);
- EndoFine[®] é um produto fabricado pela empresa canadense Sylvan[®] Bioproducts, composto por esporos de *C. rosea* (15%) e um carreador estéril (85%), não especificado. Esse produto apresenta o fungo *C. rosea* como um inoculante endofítico capaz de estabelecer relações simbióticas com as plantas, melhorando suas taxas de absorção de nutrientes essenciais e de micronutrientes e, com isso, aumentando a vitalidade e a tolerância das plantas em relação ao estresse ambiental e as doenças (bula apresentada no ANEXO 2).

Devido às informações insuficientes sobre a formulação dos esporos de *C. rosea* disponíveis na literatura, esta parte do processo precisa receber mais atenção.

2.3 MECANISMOS DE AÇÃO DO FUNGO *Clonostachys rosea* NO PROCESSO DE CONTROLE BIOLÓGICO

Agentes de biocontrole antagonizam patógenos causadores de doenças ou pragas através de estratégias denominadas de mecanismos de ação. Um agente de biocontrole emprega ao menos um mecanismo para antagonizar patógenos vegetais ou pragas (IRTWANGE, 2006), mas, muitas vezes, ocorre uma sinergia entre diferentes mecanismos (BENÍTEZ *et al.*, 2004). Assim, uma maior compreensão destes mecanismos de ação pode auxiliar no desenvolvimento e no aperfeiçoamento de formulações e de sistemas de aplicação de produtos de biocontrole (MONTESINOS, 2003).

C. rosea possui habilidade para atacar uma ampla gama de fungos e de estruturas fúngicas como hifas, esporos e esclerótios (IRTWANGE, 2006). Trabalhos na literatura sugerem que *C. rosea* possui diversos mecanismos de ação, os quais podem ser utilizados em diferentes situações:

1) Competição por nutrientes: os microrganismos possuem diferentes meios para obtenção de nutrientes, assim, os mais adaptados obtêm a maioria dos nutrientes e se desenvolvem enquanto os menos adaptados morrem devido à insuficiência de nutrientes.

A competição é um mecanismo extensivamente relatado para *C. rosea* em plantas hospedeiras (SUTTON; PENG, 1993; SUTTON *et al.*, 1997; MORANDI, 2008). Morandi *et al.* (2000, 2001) atribuem a eficácia de *C. rosea* a sua habilidade de colonizar tecidos senescentes e mortos mais rapidamente e assim suprimir a esporulação do patógeno. Além disso, é um mecanismo particularmente importante no biocontrole de fitopatógenos como *B. cinerea*, visto que ele é muito sensível à falta de nutrientes (LATORRE⁷; LILLO; RIOJA, 2001, citado por BENÍTEZ *et al.*, 2004).

⁷ LATORRE, B.A.; LILLO, C.; RIOJA, M.E. Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.28, p.61-66, 2001.

2) Antibiose: é o mecanismo de inibição do desenvolvimento ou de destruição de um microrganismo por substâncias, como metabólitos específicos ou não-específicos, agentes líticos ou enzimas, que são produzidas e secretadas por um agente de biocontrole nas áreas vizinhas ao seu crescimento (BENÍTEZ *et al.*, 2004; IRTWANGE, 2006; VERMA *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos indicam a antibiose como um dos mecanismos de ação de *C. rosea* (SUTTON; PENG, 1993; KOHL *et al.*, 1997; SUTTON *et al.*, 1997), entretanto, os resultados são inconclusivos. Em geral, a antibiose ocorre somente em pequenas distâncias e, devido a isso, a competição por nutrientes poderia impedir ou se sobressair a antibiose (DEACON⁸; BERRY, 1992, citado por SUTTON *et al.*, 1997). Existem relatos sobre a produção de toxinas e de metabólitos antifúngicos por *C. rosea*, entretanto, poucos estudos apresentam o isolamento, a identificação e comprovação da ação antibiótica destas substâncias no controle biológico (PENG⁹, 1991, citado por SUTTON *et al.*, 1997; PACHENARI¹⁰; DIX, 1980, citado por LI *et al.*, 2002).

3) Fator de indução de resistência ou de indução de crescimento na planta hospedeira: esse mecanismo pressupõe que a associação de agentes de biocontrole com partes das plantas (por exemplo, raízes) promove a indução de enzimas líticas pelo sistema de defesa das plantas, as quais degradam a parede celular dos patógenos, gerando nutrientes para as plantas (VERMA *et al.*, 2007).

Sutton *et al.* (1997) considera a indução de resistência em plantas hospedeiras por *C. rosea* uma possibilidade intrigante, principalmente devido as prolongadas associações entre este antagonista e tecidos vivos de muitos hospedeiros.

Com relação à indução de crescimento, o isolado IK726 de *C. rosea* aumentou significativamente a massa seca de plântulas de tomate (RAVNSKOV *et al.*, 2006) e de cevada (JOHANSEN *et al.*, 2005). De acordo com Ravnskov *et al.* (2006), o efeito de indução de crescimento de plantas em solo não havia sido

⁸ DEACON, J. W.; BERRY, L. A. Modes of action of mycoparasites in relation to biocontrol of soilborne plant pathogens. In: **Biological Control of Plant Diseases; Progress and Challenges for the Future**. E. C. Tjamos, G. C. Papavizas, and R. J. Cook, eds. Plenum Press, London, p.157-167, 1992.

⁹ PENG, G. Biological control of grey mold (*Botrytis cinerea*) on strawberries. Ph.D. thesis. University of Guelph, Guelph, Canada, 1991.

¹⁰ PACHENARI, A.; DIX, N.J. Production of toxins and wall degrading enzymes by *Gliocladium roseum*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.74, p.561-566, 1980.

reportado para outro isolado de *C. rosea*. Neste trabalho os autores verificaram ainda que a indução do crescimento das plantas coincidiu com um aumento no teor de fósforo e sugeriram que *C. rosea* pode ser o responsável pelo aumento na solubilização deste elemento.

4) Parasitismo: nesse mecanismo de ação, um organismo, durante parte ou por toda a vida, obtém seus nutrientes a partir de um organismo vivo de outra espécie. O termo micoparasitismo refere-se ao fenômeno de um fungo parasitar outro fungo (IRTWANGE, 2006). É um processo muito complexo e envolve eventos sequenciais, incluindo reconhecimento, ataque e subsequente penetração e morte do hospedeiro.

O micoparasitismo é amplamente citado na literatura como um dos mecanismos de ação de *C. rosea* (BARNETT; LILLY, 1962; SUTTON *et al.*, 1997; YU; SUTTON, 1997; LI *et al.*, 2002; XUE, 2003), e tem sido estudado por vários pesquisadores. Observações iniciais de Barnett e Lilly (1962) sugerem que as hifas de *C. rosea* entrelaçam ao redor das hifas dos fungos alvo e depois penetram nelas. Estas sugestões foram confirmadas recentemente por Xue (2003), que notou que *C. rosea* destruíra as hifas dos patógenos do “*pea root rot complex*” somente após estabelecer contato físico.

Em um estudo ultraestrutural sobre a interação entre *C. rosea* e o patógeno vegetal *B. cinerea*, Li *et al.* (2002) mostraram que as hifas de *C. rosea* foram capazes de penetrar diretamente nos conídios e nos tubos germinativos do fungo alvo, sem a formação de apressório. Estes pesquisadores sugerem que as marcas e a ruptura das paredes celulares de *B. cinerea*, que ocorreram em cada sítio de penetração, são evidências de que as hifas de *C. rosea* produzem força mecânica para ultrapassar a barreira da parede celular durante o processo de infecção (Fig. 3).

Alguns estudos têm sugerido ainda que a atividade de micoparasitismo de *C. rosea* envolva a secreção de enzimas para degradar a parede celular, incluindo enzimas degradadoras de quitina, glucana e celulose (GOEDEGEBUUR *et al.*, 2002; INGLIS; KAWCHUK, 2002; LÜBECK *et al.*, 2002). Entretanto, a relação direta entre estas enzimas e esse mecanismo de ação não foi comprovada. Em termos gerais, este complexo de enzimas extracelulares tem sido descrito como um fator chave na lise da parede celular do patógeno durante o micoparasitismo (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

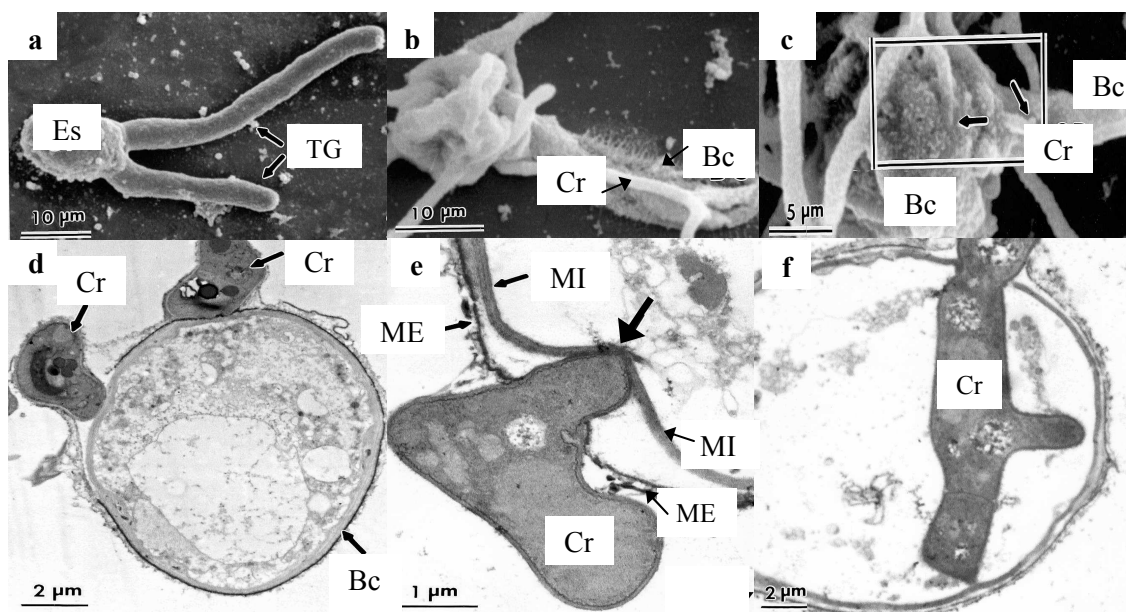


FIGURA 3 – MICOPARASITISMO DE *Clonostachys rosea* EM *Botrytis cinerea*

(a) MEV de um esporo (Es) saudável de *B. cinerea* com dois tubos germinativos (TG); (b) Esporos e tubos germinativos de *B. cinerea* (Bc) colonizados por hifas de *C. rosea* (Cr); (c) Detalhes dos sítios de penetração das hifas de *C. rosea* em um esporo de *B. cinerea* (setas); (d) Células da hifa de *C. rosea* (Cr) em contato fixo com um esporo de *B. cinerea* (Bc); (e) Hifas de *C. rosea* (Cr) invadindo a parede celular de um esporo de *B. cinerea* (Bc) entre a membrana externa (ME) e a membrana interna (MI). Detalhe da marca (seta maior) da membrana interna (MI) da parede celular do esporo de *B. cinerea* (Bc) causado pela penetração da hifa de *C. rosea* (Cr); (f) Presença de uma hifa ramificada de *C. rosea* (Cr) no lúmen celular de um esporo infectado de *B. cinerea* (Bc). Observe a desintegração do citoplasma do esporo infectado.

FONTE: (LI *et al.*, 2002)

Com base nestas considerações, nota-se que as propriedades mecânicas e químicas da parede celular de *C. rosea* devem desempenhar um papel importante no mecanismo de ação de por micoparasitismo. A parede celular fúngica não somente protege as células contra as condições ambientais hostis quando o agente de biocontrole está disperso no meio ambiente, mas também atua como mediador nas interações com as células de outros organismos (ROSADO *et al.*, 2007). Entretanto, como a composição da parede celular de *C. rosea* não foi previamente estudada, não existem bases para entender sua função neste mecanismo.

2.4 POLISSACARÍDEOS DA FAMÍLIA BIONECTRIACEAE

Em termos gerais, sabe-se que as paredes celulares fúngicas contêm mais de 75% de polissacarídeos em massa e que, em adição aos polissacarídeos responsáveis pela força mecânica, alguns polissacarídeos constituem uma bainha extracelular ao redor do micélio como parte integrante da parede celular. Esta bainha desempenha funções durante o crescimento do fungo em substratos naturais, sendo parcialmente dissolvida no meio de cultura quando o fungo é cultivado em meio líquido e é denominada de exopolissacarídeo (EPS) (GUTIÉRREZ, 1996).

A única informação encontrada na literatura sobre os polissacarídeos de *C. rosea* foi um espectro de RMN- ^1H de um extrato particular da biomassa, a fração denominada de F1SS (*Cell wall alkali-extractable water-soluble polysaccharide*), obtida pela extração com 1 M de NaOH na temperatura ambiente com um subsequente processo de purificação por emprego de colunas, relatado por Ahrazem *et al.* (1999) (Fig. 4). Entretanto, este trabalho apresentou apenas uma comparação entre espectros de RMN de ^1H obtidos de polissacarídeos de diversos fungos, sem identificação das estruturas químicas.

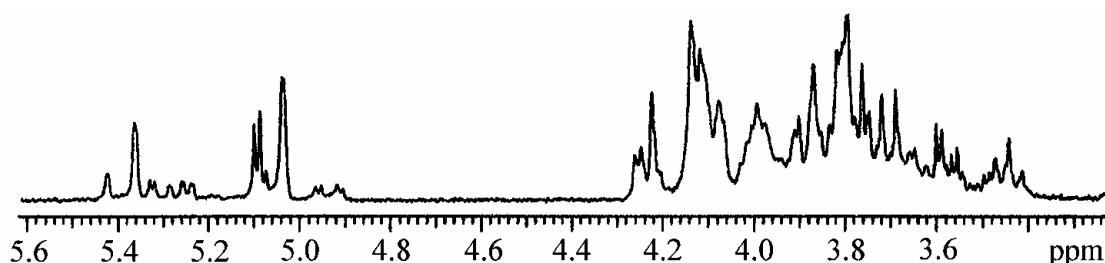
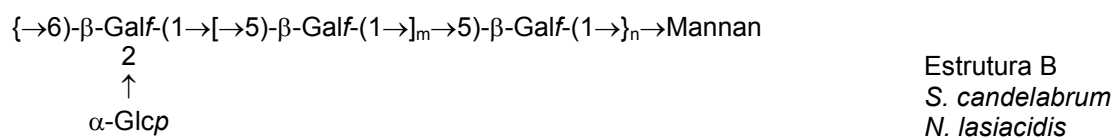
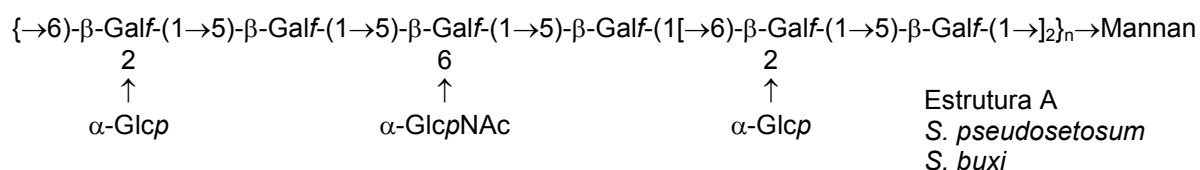


FIGURA 4 – RMN DE ^1H DO POLISSACARÍDEO DA FRAÇÃO F1SS DE *Clonostachys rosea* (300 MHz, D_2O , 40 °C)

FONTE: (AHRAZEM *et al.*, 1999)

Embora não existam estudos de caracterização bioquímica e estrutural de polissacarídeos de *C. rosea*, existem propostas de estruturas para polissacarídeos da parede celular de quatro fungos que pertencem à Família Bionectriaceae, a mesma do fungo *C. rosea*: *Sesquicillium pseudosetosum*, *Sesquicillium buxi*, *Sesquicillium candelabrum* e *Nectria lasiacidis* (AHRAZEM *et al.*, 2001b).

Estes polissacarídeos foram isolados da fração F1SS, sendo compostos por glucose, manose e altas porcentagens de galactose. O procedimento de metilação confirmou a similaridade entre as estruturas dos polissacarídeos destes quatro fungos. As espécies apresentam em comum altas porcentagens de terminais não redutores de glucopiranosose (“Glc p -(1→”) e resíduos de galactofuranose substituídos de duas maneiras diferentes: 5-O-substituído (“→5)-Gal f -(1→”) e 2,6-di-O-substituído (“→2,6)-Gal f -(1→”). Com base nestes resultados, Ahrazem *et al.* (2001b) propuseram as seguintes estruturas:



3 JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E ESTRATÉGIA

Como foi relatada na introdução, esta tese tem duas vertentes relacionadas à ação de biocontrole do fungo *C. rosea* – um estudo de formulação dos esporos e um estudo dos carboidratos de sua parede celular.

3.1 FORMULAÇÃO DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea*

As informações sobre formulações disponíveis para os esporos de *C. rosea* na literatura e nas bulas comerciais são escassas (Tab. 1). Poucos estudos completos de formulações para aplicação a campo têm sido feitos (com testes de viabilidade e de eficácia de esporos durante períodos de armazenamento). Assim, com intuito de preencher essa lacuna, o primeiro objetivo geral desta tese é desenvolver uma formulação adequada para os esporos de *C. rosea*, capaz de manter seus esporos viáveis e eficazes pelo maior período de tempo possível. A partir disso, foram definidos os seguintes objetivos específicos e estratégias de ação (Fig. 5):

a) *definir um protocolo para avaliação da germinação dos esporos;*

Este objetivo específico foi necessário visto que na literatura não foi encontrado um protocolo simples para a determinação da viabilidade de esporos de *C. rosea*. Desta maneira, foi necessário adaptar e aprimorar métodos utilizados para outros fungos. Assim, as metas desta etapa foram: (1) testar diferentes métodos de germinação de esporos visando encontrar um método adequado, de fácil execução e reprodutível; e (2) elucidar a cinética de germinação dos esporos no método selecionado para determinar o tempo ideal de incubação dos esporos para realizar a avaliação da viabilidade.

b) *desenvolver um bioensaio para avaliação da eficácia dos esporos;*

Antes de iniciar os estudos de formulação, foi necessário definir um método para avaliar a eficácia dos esporos de *C. rosea*, entretanto, não foi encontrado na literatura um método confiável e reprodutível. Outro fator importante a ser considerado é a impraticabilidade de realizar testes de campo, sendo assim, o desenvolvimento do método fica limitado a procedimentos de laboratório. Entretanto, os métodos laboratoriais desenvolvidos para *C. rosea* utilizam material vegetal (por exemplo, folhas de morangueiro) que podem apresentar variações entre os lotes.

As metodologias de bioensaios realizadas em laboratório para fungos são descritas, na maioria, para fungos patógenos de larvas de insetos e para tratamento de sementes. Os testes que avaliam a eficácia do controle de fungos por outros fungos são meramente qualitativos e se baseiam em observações simples em microscópios ou em análise de imagens por escalas desenvolvidas para avaliar a colonização. Estes testes qualitativos não permitem avaliar com precisão a eficácia dos esporos de *C. rosea* frente ao antagonista escolhido, o fungo causador do mofo cinzento *Botrytis cinerea*. Devido a isso, a finalidade desta etapa foi o desenvolvimento de um bioensaio para laboratório, prático, de fácil execução e avaliação.

c) *determinar o efeito de diferentes formulações na viabilidade e eficácia dos esporos;*

Um ponto importante a ser considerado é a técnica utilizada para a formulação do biofungicida, uma vez que, continuando o trabalho desenvolvido por Viccini (2004), a finalidade desta pesquisa é encontrar uma forma alternativa e eficaz para desenvolver um biofungicida que possa ser transferida diretamente aos produtores, permitindo que eles próprios produzam e armazenem o produto biológico de um modo “artesanal”.

Frente a isto, buscou-se selecionar um método relativamente barato, mais prático e de fácil execução, e um carreador inerte e de baixo custo. Essas características se adaptaram a formulação em pó, a qual traz ainda como vantagens a facilidade do manuseio, da dispersão do produto e a redução dos índices de contaminação (FRIER *et al.*, 1999).

A finalidade desta etapa foi realizar um experimento de formulação completo, desde a produção dos esporos até a formulação, utilizando diferentes processos (Fig. 5 A2). Além disso, foram feitas três FES com diferentes regimes de secagem para avaliar o efeito na viabilidade pós-formulação (Fig. 5 A1). Nesta etapa foram utilizados os protocolos de produção de esporos desenvolvidos por Viccini (2004). Durante todo o processo a viabilidade e a eficácia dos esporos de *C. rosea* foram avaliadas através dos protocolos desenvolvidos nas etapas anteriores.

- d) *determinar o efeito de armazenamento na viabilidade e eficácia dos esporos;*

Após realizar a formulação dos esporos, esses produtos foram armazenados em temperatura ambiente e em geladeira visando determinar a vida de prateleira de cada formulação. Esse processo envolveu novamente os testes de eficácia e de germinação de esporos (Fig. 5 A3).

3.2 POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA E EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Clonostachys rosea*

Em relação à caracterização de carboidratos do fungo *C. rosea*, foram definidos os seguintes objetivos específicos e estratégias de ação (Fig. 5):

- a) *extrair os polissacarídeos a partir do micélio de C. rosea após processo de fermentação líquida de superfície (FLS);*

Nesta etapa, o micélio, obtido após a filtração da FLS, foi submetido a vários processos de extração, inicialmente com água quente e, a seguir, com solução alcalina (Fig. 5 B2.1). Somente foram purificadas as frações de maior rendimento.

- b) *recuperar os exopolissacarídeos liberados no meio de cultivo por C. rosea após processo de FLS;*

O meio de cultivo, obtido após a filtração da FLS, foi utilizado para precipitação dos EPS (Fig. 5 B2.2).

c) *purificar os principais polissacarídeos obtidos;*

As principais frações obtidas – extração aquosa dos polissacarídeos do micélio e EPS – foram purificadas através de diálises seqüenciais com membranas de diferentes limites de exclusão (Fig. 5 B3).

d) *caracterizar estruturalmente os principais polissacarídeos obtidos utilizando métodos químicos e espectroscópicos.*

Nesta etapa foram utilizados métodos químicos e espectroscópicos, como CG-EM, RNM- ^{13}C , RNM- ^1H , HMQC e COSY, para determinar a estrutura química das frações purificadas, através de comparação com dados da literatura (Fig. 5 B4).

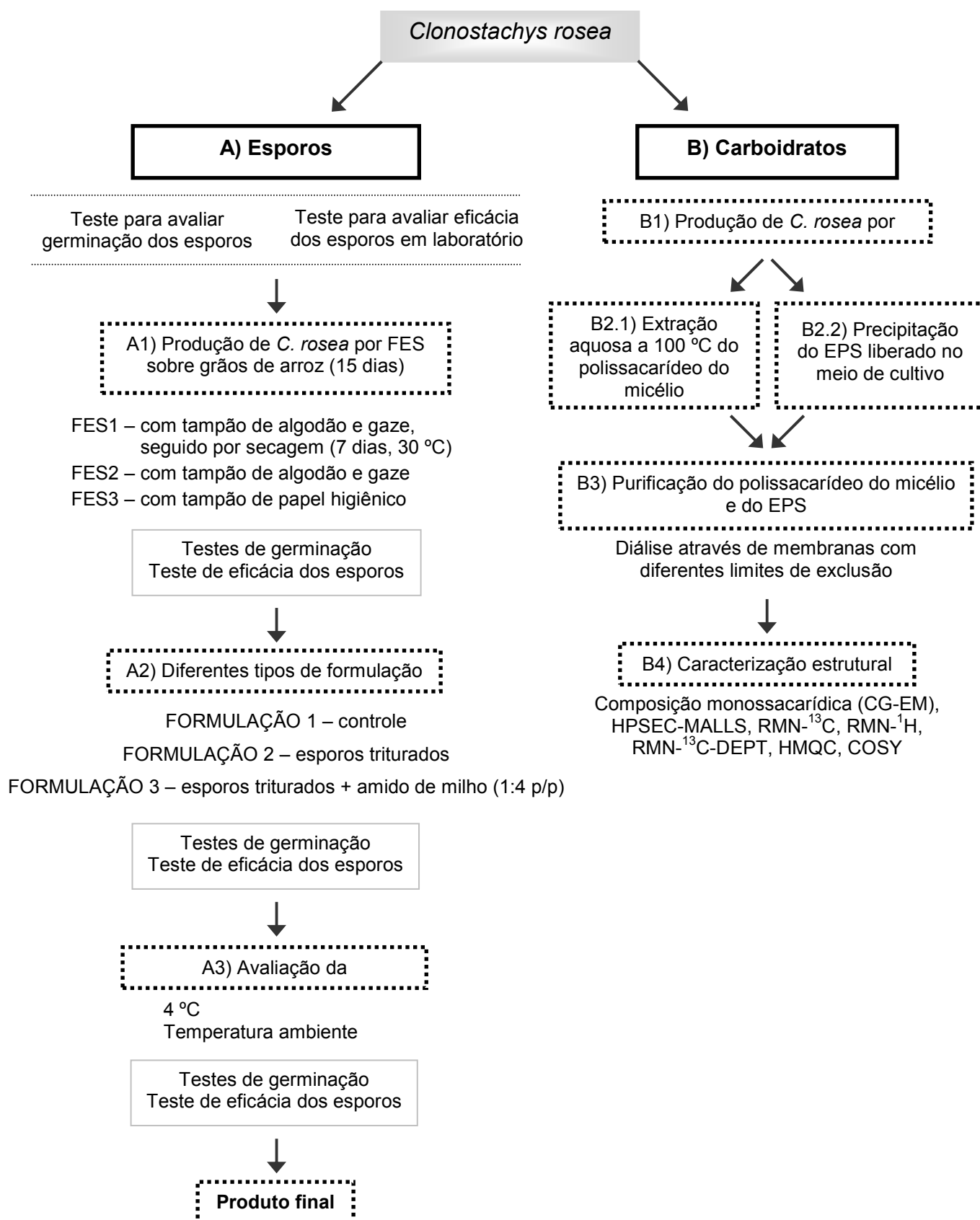


FIGURA 5 – FLUXOGRAMA GERAL DA ESTRATÉGIA DE TRABALHO

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

Nos experimentos foram utilizados os fungos *Clonostachys rosea* (cepa GP04) e *Botrytis cinerea* (cepa CNPUV56), gentilmente cedidos pela EMBRAPA Meio Ambiente (Jaguariúna/SP) e EMBRAPA Uva e Vinho (Bento Gonçalves/RS), respectivamente. O repique das culturas foi realizado a cada 2 meses em placa de Petri com meio batata-dextrose-ágar – BDA (Merck). Um disco de micélio, em meio BDA, de 0,5 cm de diâmetro, foi colocado no centro da placa a ser colonizada. Os discos foram obtidos a partir do corte do micélio crescido em placa de Petri contendo meio sólido, utilizando um tubo de aço inoxidável com ponta afiada. As placas foram incubadas a 24 °C, 24 h luz com lâmpadas fluorescentes, tipo “luz do dia” de 20 W, por 20 dias e, posteriormente, armazenadas em geladeira a 4 °C. Essas condições de incubação foram utilizadas em todos os experimentos, sendo referidas de maneira simplificada nas seções seguintes.

4.2 PREPARO DO INÓCULO DE *Clonostachys rosea*

O preparo das placas utilizadas para inóculo foi feito de acordo com o seguinte protocolo: (1) 2 discos de micélio, de 0,5 cm de diâmetro, foram retirados de uma cultura do fungo em BDA; (2) esses discos foram colocados em um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada e Tween 20 (0,01% v/v), previamente esterilizados, (3) o tubo de ensaio foi agitado em Vórtex para liberação dos esporos dos discos e (4) uma alíquota de 0,3 mL desta suspensão foi espalhada na superfície de uma nova placa contendo BDA. Após a inoculação, cada placa foi fechada mas não foi selada com filme de PVC, o que permitiu uma esporulação mais rápida. Elas foram incubadas a 24 °C, 24 h luz, por 8 dias.

O inóculo constituiu-se de uma suspensão de esporos feita a partir de uma destas placas. Para isso, adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada e, com o auxílio de uma espátula arame, fez-se a raspagem dos esporos da superfície do meio. Este procedimento foi repetido mais uma vez, perfazendo um total de 20 mL de inóculo por placa. A concentração desta suspensão de esporos foi ajustada para 1×10^7 esporos mL^{-1} (VICCINI, 2004).

4.3 DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO PARA OS ESPOROS DE *Clonostachys rosea*

4.3.1 Preparo e inoculação do meio de cultura com *Clonostachys rosea* – Metodologia geral

Os frascos de erlenmeyer (250 mL) foram inicialmente identificados e pesados. A seguir, aproximadamente 10 g de substrato arroz branco tipo agulhinha não parboilizado e 7,5 mL de água destilada foram colocados em cada um. Após isto, foram novamente pesados. Na seqüência estes frascos de erlenmeyer foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados por 15 minutos a 121 °C (VICCINI, 2004).

O substrato utilizado nos experimentos é orgânico, isto é, produzido sem o uso de agroquímicos. Esta opção foi feita para evitar qualquer tipo de influência nos resultados, principalmente no que diz respeito a resíduos de fungicidas nos grãos utilizados, o que poderia afetar o desenvolvimento de *C. rosea*.

O preparo do inóculo foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.2. Cada frasco foi inoculado com 0,5 mL de uma suspensão de 1×10^7 esporos mL^{-1} de *C. rosea*. A contagem dos esporos da suspensão foi feita em Câmara de Neubauer. A seguir, os frascos foram incubados a 24 °C e 24 h de luz.

4.3.2 Teste de secagem lenta

O preparo dos erlenmeyers foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.3.1, utilizando 10 g de arroz branco tipo agulhinha não parboilizado e 7,5 mL de água destilada. Na sequência, estes erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados por 15 minutos a 121 °C. Ao invés de inocular os erlenmeyers com 0,5 mL de solução de esporos de *C. rosea*, foram adicionados 0,5 mL de água destilada a cada frasco.

Para avaliar o efeito de diferentes formas de fechamento dos erlenmeyers sobre a cinética do processo de secagem, foram testadas 5 formas de fechar os erlenmeyers:

- tampões de algodão e gaze (padrão utilizado durante a FES);
- pedaço de papel higiênico folha simples;
- pedaço de papel higiênico folha dupla;
- pedaço de papel toalha e
- pedaço de papel filtro (J. Prolab, Qualy[®], 12,5 cm diâmetro, porosidade 14 µm).

A secagem lenta dos erlenmeyers (4 frascos por tratamento) foi feita em estufa com ventilação a 30 °C. Os frascos foram pesados diariamente até o 8º dia e a cada dois dias até o 14º dia.

A partir destes dados foi calculada a umidade (%), em base úmida, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Umidade (base úmida)} = \frac{\text{massa úmida} - \text{massa seca}}{\text{massa úmida}} \times 100\%$$

Os resultados são apresentados como média das quadruplicatas \pm erro padrão.

4.3.3 Extração de esporos dos grãos de arroz colonizados por *Clonostachys rosea*

O procedimento de extração de esporos dos grãos de arroz colonizados por *C. rosea* (FES) foi utilizado como parte dos protocolos de avaliação do processo de fermentação (produção de esporos) e das etapas de formulação e de estocagem, através dos testes de germinação e de eficácia dos esporos.

Após mistura prévia do substrato colonizado, uma amostra foi retirada de cada erlenmeyer com auxílio de uma espátula esterilizada (1 g de amostra para os tratamentos controle e triturado, e 5 g de amostra para o tratamento triturado e misturado com amido de milho). Cada amostra foi colocada em um béquer contendo 50 mL de solução aquosa de Tween 20 (0,01% v/v) esterilizado, e mantida em agitador magnético durante 30 minutos para extração dos esporos dos grãos de arroz. Em seguida, procedeu-se a contagem dos esporos utilizando Câmara de Neubauer.

Em cada teste de germinação foi feita uma diluição até obter uma concentração de 10^5 esporos/mL, utilizada na inoculação das lâminas. No teste de eficácia dos esporos por titulação, foram feitas diluições seqüenciais para obter concentrações entre 10^7 e 10^3 esporos/mL. No teste de eficácia dos esporos realizado nas maçãs, a concentração dos esporos foi ajustada para 10^7 esporos/mL antes da inoculação. Esse processo de extração foi feito para cada tratamento e em cada tempo de amostragem determinado (seção 4.3.7.4).

4.3.4 Teste de germinação dos esporos - Viabilidade

4.3.4.1 Sistema de deposição de gota sobre lâmina

Nos testes de germinação de esporos de *C. rosea*, foi utilizado o Sistema de Deposição de Gota sobre Lâmina (DHINGRA; SINCLAIR, 1996; MICHEREFF *et al*, 2003). Os ensaios foram conduzidos em placas de Petri de vidro (15 cm de diâmetro) contendo um pedaço de algodão umedecido (câmara úmida). Dentro de cada placa foram colocadas 3 lâminas de microscopia apoiadas em palitos de

fósforo (Fig. 6a). Sobre cada lâmina foram distribuídos 1,5 mL de meio de cultivo. Cada lâmina foi dividida em 3 áreas (Fig. 6b). Em cada área foi colocado 0,05 mL de uma suspensão de esporos de *C. rosea* (10^5 esporos/mL), de forma pontual, com auxílio de uma micropipeta de 200 μ L (Fig. 6b). Essa suspensão de esporos foi obtida através do procedimento de extração de esporos dos grãos de arroz colonizados por *C. rosea*, de acordo com o protocolo descrito na seção 4.3.3.

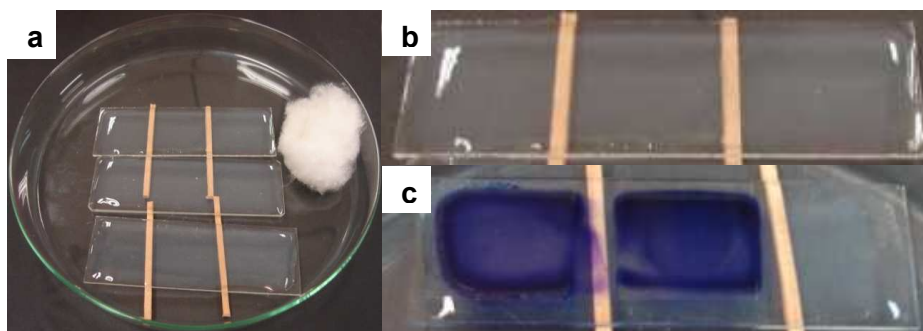


FIGURA 6 – TESTE DE DEPOSIÇÃO DE GOTA SOBRE LÂMINA

Na seqüência, as placas foram incubadas a 24 °C, 24 h de luz, por 12 h. Após esse período, foi adicionada uma gota de corante Azul de Aman sobre cada uma das áreas da lâmina (Fig. 6c). A seguir, cada lâmina foi visualizada no microscópio óptico (aumento de 400 vezes) para avaliar o número de esporos germinados e não germinados. O esporo foi considerado germinado quando seu tubo germinativo apresentou comprimento superior ao seu maior diâmetro (MICHEREFF *et al*, 2003; BEZERRA, 2007). Para isso foi feita a contagem de 100 esporos por área e foi determinada a porcentagem de germinação de esporos em triplicata por lâmina, sendo que foram avaliadas 3 lâminas para cada tratamento aplicado e em cada tempo de amostragem determinado (seção 4.3.7.4). Assim, a porcentagem de germinação em cada avaliação é apresentada como média das nove contagens.

4.3.4.2 Testes preliminares

Inicialmente, foi realizado um teste preliminar para determinar a forma básica da cinética de germinação dos esporos de *C. rosea* e um teste para avaliar o efeito do meio de cultivo utilizado no ensaio sobre a cinética de germinação dos esporos. Foram testados dois meios de cultivo: BDA e ágar-água (Biobrás).

A suspensão de esporos de *C. rosea* para os testes preliminares foi preparada de acordo com a seção 4.2, a partir de culturas de 8 dias em placas de BDA. Nestes testes as placas foram incubadas a 24 °C, 24 h de luz. Nos tempos de avaliação estabelecidos, compreendidos de 0 a 12 h, foi retirada uma lâmina de uma câmara úmida e foi adicionada uma gota de corante Azul de Aman sobre cada uma das áreas da lâmina para proceder à avaliação do número de esporos germinados e determinar a porcentagem de germinação. Os resultados são apresentados como média das triplicatas \pm erro padrão. Nos casos em que as barras de erro não aparecem, considera-se que os erros foram menores que os tamanhos dos símbolos utilizados nos gráficos.

4.3.4.3 Teste de viabilidade dos esporos do produto comercial Clonostat PM[®]

O teste de germinação de esporos para o produto comercial Clonostat PM[®] (Empresa Natural Rural Ind. e Com. de Produtos Orgânicos e Biológicos Ltda) foi feito de acordo com as instruções da bula do produto. Para isso, foi feita uma suspensão de 0,01 g do produto em 100 mL de água destilada esterilizada. Na sequência, 0,2 mL da suspensão previamente agitada foram distribuídos em placas de Petri com meio BDA. Essas placas foram incubadas a 20 °C, 24 h de luz por 7 dias. Foram analisadas 3 amostras do produto e para cada amostra foram preparadas 3 placas.

4.3.5 Teste de eficácia dos esporos de *Clonostachys rosea* por Titulação

Foi desenvolvido um bioensaio para laboratório, denominado de Teste de Titulação (em analogia com os testes feitos com vírus). Seu objetivo foi encontrar a menor concentração de esporos de *C. rosea* capaz de reprimir o crescimento de *B. cinerea*.

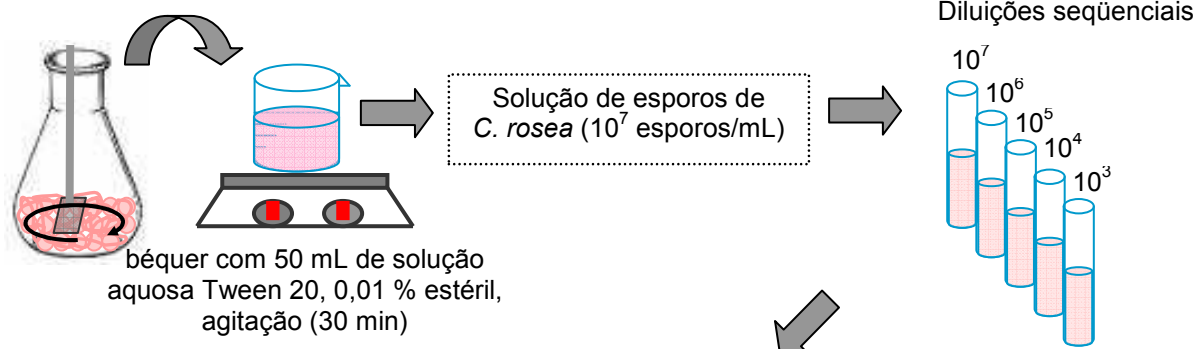
Inicialmente, uma suspensão de esporos foi obtida através do procedimento de extração de esporos dos grãos de arroz colonizados por *C. rosea* (protocolo descrito na seção 4.3.3) para cada tratamento aplicado e em cada tempo de amostragem determinado (seção 4.3.7.4). A partir da solução foram feitas diluições seqüências, obtendo-se soluções de 10^7 até 10^3 esporos/mL. Para cada uma destas concentrações, foi inoculada uma placa de Petri plástica e estéril contendo BDA, sendo que cada placa foi dividida em 4 áreas e em cada área foi colocado 0,01 mL de suspensão de esporos, pontual, com auxílio de uma micropipeta de 20 μ L. Essas placas foram incubadas por 24 h, 24 °C (Fig. 7).

Após esse período, foi preparada uma suspensão de esporos de *B. cinerea* a partir de uma placa. Para isso, adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada e, com o auxílio de uma espátula arame, fez-se a raspagem dos esporos da superfície do meio. Este procedimento foi repetido mais uma vez, perfazendo um total de 20 mL de inóculo por placa. A contagem dos esporos da suspensão foi feita em Câmara de Neubauer e a concentração da suspensão foi ajustada para 10^6 esporos/mL, sendo que as placas com *B. cinerea* eram sempre de 7 dias de cultivo, para manter um padrão de viabilidade de esporos.

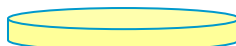
Foi colocado 0,01 mL de suspensão de esporos de *B. cinerea* sobre cada ponto em cada uma das placas contendo as diferentes diluições de *C. rosea*, de forma pontual, com auxílio de uma micropipeta de 20 μ L (Fig. 7). As placas foram incubadas novamente a 24 °C, 24 h de luz, e mantidas sob observação. A avaliação foi feita após 7 dias. Foram anotadas as concentrações de inóculo de *C. rosea* em que o fungo *B. cinerea* conseguiu se desenvolver.

Foi realizado um teste preliminar para verificar se o método era factível. Neste caso a suspensão de esporos de *C. rosea* foi preparada a partir de um cultivo de 8 dias em placas com BDA, de acordo com a seção 4.2.

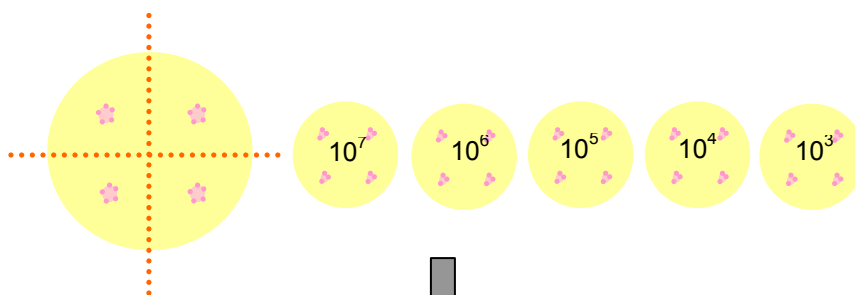
≈ 1 g de amostra, retirada após
mistura (para cada tratamento)



Inoculação das placas (15 mL BDA/placa)



P/ cada diluição: divisão da placa em 4 áreas → 0,01 mL inóculo /
área, pontual (pipeta P20), 24 °C e 24 h luz por 24 h



Após 24 h (tempo para *C. rosea* se desenvolver) ...



Inoculou 0,01 mL de *B. cinerea* (1×10^6 esporos/mL)
sobre cada spot de *C. rosea*

FIGURA 7 – PROTOCOLO DO TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea* POR TITULAÇÃO

4.3.6 Teste de eficácia dos esporos de *Clonostachys rosea* em maçãs

A eficácia dos esporos de *C. rosea* foi testada utilizando como substrato maçãs maduras e saudáveis (Maçãs Turma da Mônica®, Fischer). Em cada maçã foram feitos dois furos em locais opostos na superfície da fruta, próximo ao pedicelo. Cada furo foi feito com auxílio de uma Pipeta Pasteur esterilizada (diâmetro de 2 mm e profundidade de 2 mm) (Fig. 8). O preparo da suspensão de esporos de *C. rosea* foi feito através do procedimento de extração de esporos dos grãos de arroz colonizados por *C. rosea* (protocolo descrito na seção 4.3.3) para cada tratamento aplicado e em cada tempo de amostragem determinado (seção 4.3.7.4). Após perfurar as maçãs, foi adicionada uma gota (0,01 mL) de suspensão de esporos, com auxílio de uma micropipeta de 20 µL, em cada um dos furos. O controle foi feito utilizando água ao invés de solução de esporos de *C. rosea*. Cada maçã foi acondicionada em um pote plástico com tampa e incubada por 24 h, 24 °C.

Após esse período, foi preparada uma suspensão de esporos de *B. cinerea* a partir de uma placa. Para isso, adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada e, com o auxílio de uma espátula arame, fez-se a raspagem dos esporos da superfície do meio. Este procedimento foi repetido mais uma vez, perfazendo um total de 20 mL de inóculo por placa. A contagem dos esporos da suspensão foi feita em Câmara de Neubauer e a concentração da suspensão foi ajustada para 10⁶ esporos/mL, sendo que as placas com de *B. cinerea* eram sempre de 7 dias de cultivo, para manter um padrão de viabilidade de esporos. Foi adicionado 0,01 mL de uma suspensão de esporos de *B. cinerea* em cada furo das maçãs com auxílio de uma micropipeta de 20 µL (Fig. 8). As maçãs foram incubadas novamente a 24 °C, 24 h de luz, e mantidas sob observação. A eficácia dos esporos de *C. rosea* foi avaliada através do diâmetro médio das lesões típicas causadas por *B. cinerea* ao redor de cada furo de inoculação, que foi mensurado após 14 dias de incubação. Foram utilizadas 3 maçãs para avaliar cada tratamento em cada tempo de amostragem, que representam 6 locais de inoculação (6 replicatas) por tratamento.

Foi realizado um teste preliminar para verificar se o método era factível. Neste caso a suspensão de esporos de *C. rosea* foi preparada a partir de um cultivo de 8 dias em placas contendo BDA, de acordo com a seção 4.2.

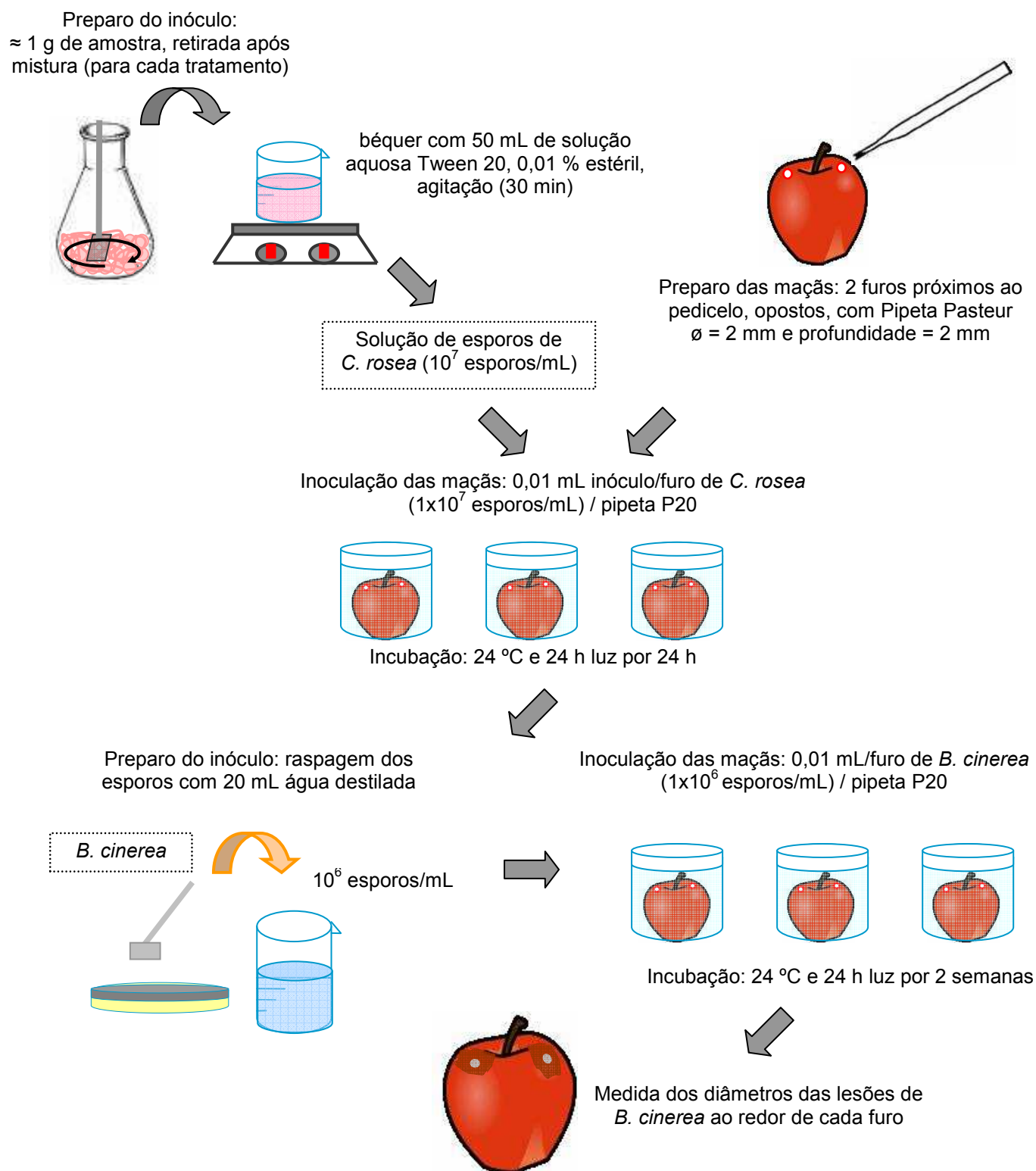


FIGURA 8 – PROTOCOLO DO TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea* EM MAÇÃ

4.3.7 Experimento completo de formulação dos esporos de *Clonostachys rosea*

Foi realizado um teste completo de formulação para os esporos de *C. rosea*, incluindo as etapas de fermentação, secagem, estudos de formulação e de armazenamento (Fig. 9). A metodologia e os materiais empregados nestas etapas são apresentados na sequência.

4.3.7.1 Fermentações em diferentes condições de secagem

Foram feitas 3 fermentações em estado sólido (FES-1, FES-2 e FES-3) utilizando arroz branco tipo agulhinha como substrato. O preparo dos erlenmeyers foi feito conforme descrito na seção 4.3.1, utilizando 10 g de substrato e 7,5 mL de água destilada. Na sequência, estes erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e gaze e autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

O preparo do inóculo de *C. rosea* foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.2. Cada frasco foi inoculado com 0,5 mL de uma suspensão de 10^7 esporos mL⁻¹ de *C. rosea*. A contagem dos esporos da suspensão foi feita em Câmara de Neubauer.

Os tampões de algodão e gaze dos erlenmeyers da FES-3 foram substituídos por pedaços de papel higiênico não esterilizados após a inoculação. Sabe-se que o uso de papel higiênico aumenta a disponibilidade de oxigênio e favorece uma secagem mais rápida (perda de umidade) do meio porque representa uma barreira menor à difusão de oxigênio e vapor. Os erlenmeyers das FES-1 e FES-2 permaneceram fechados com tampões de algodão e gaze. A seguir, os frascos foram incubados a 24 °C e 24 h de luz, durante 15 dias.

Após 15 dias de fermentação, a etapa de secagem lenta foi aplicada aos erlenmeyers da FES-1. Para isso, os tampões de algodão e gaze dos erlenmeyers da FES-1 foram substituídos por pedaços de papel higiênico não esterilizado e submetidos a um processo de secagem em estufa com ventilação a 30 °C por 7 dias.

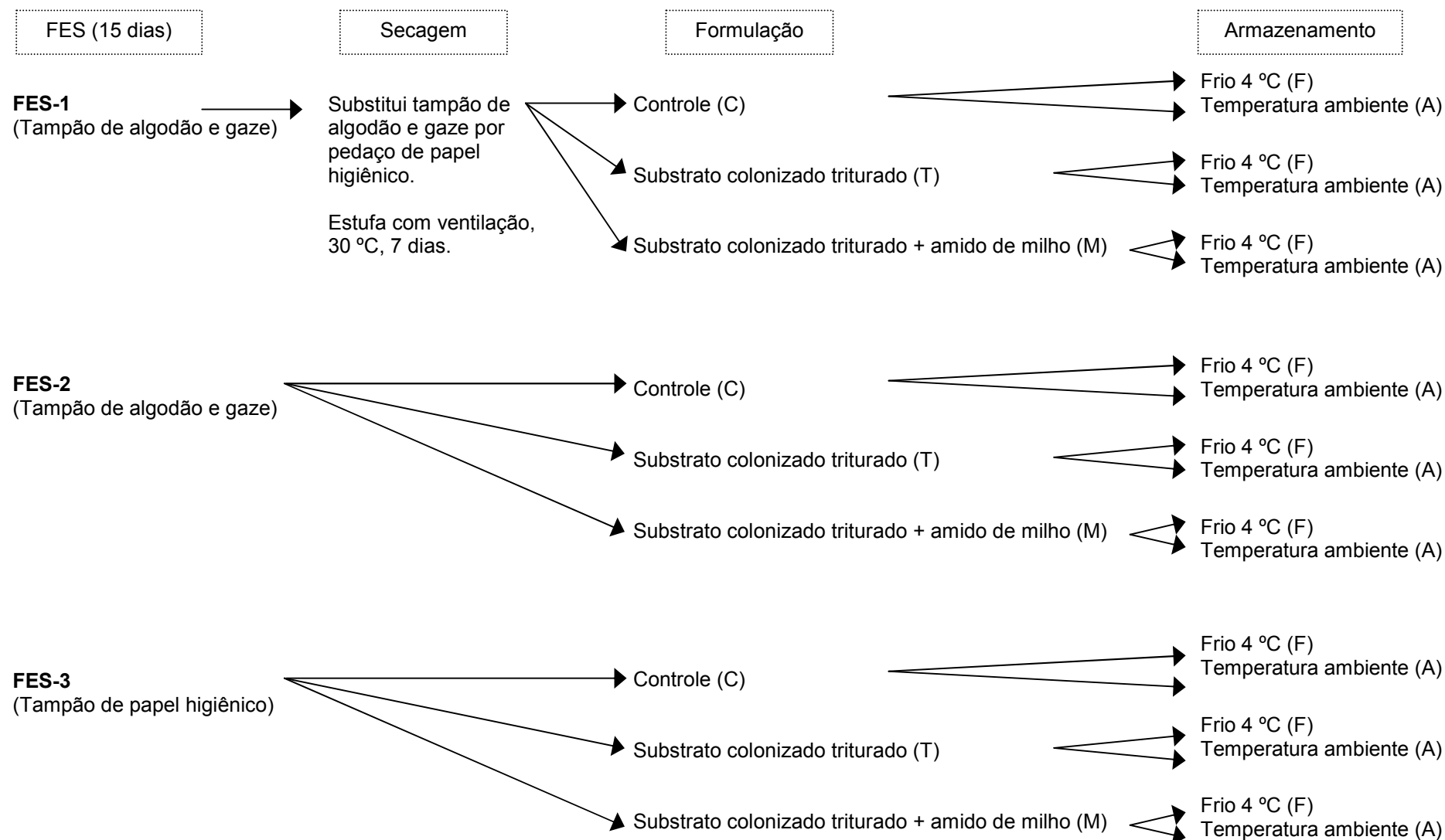


FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DO TESTE COMPLETO DE FORMULAÇÃO DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea*

4.3.7.2 Formulações

Foram feitos estudos de formulação para os substratos colonizados provenientes de cada uma das três fermentações. As FES-2 e FES-3 foram submetidas ao processo de formulação após os 15 dias de fermentação, enquanto que a FES-1 foi submetida ao processo após a etapa de secagem lenta.

Para cada uma das fermentações foram testados 3 diferentes processos de formulação:

- controle (C): o substrato colonizado foi mantido intacto dentro de cada erlenmeyer;
- triturado (T): o substrato colonizado de cada erlenmeyer foi transferido para um béquer e triturado com um *Mixer* (Teyk, XB 986), por três ciclos de 10 segundos cada, sendo posteriormente recolocado no erlenmeyer (Fig. 10 a-d);
- triturado com adição de amido de milho (M): o substrato colonizado de cada erlenmeyer foi pesado, transferido para um béquer e triturado, como no processo anterior. A seguir, o substrato triturado foi misturado com amido de milho (MAIZENA[®], DURYEA) (1:4, p/p) (Fig. 10 e), e recolocado no erlenmeyer. O amido de milho utilizado na formulação foi secado previamente em estufa a 100 °C por 8 h.

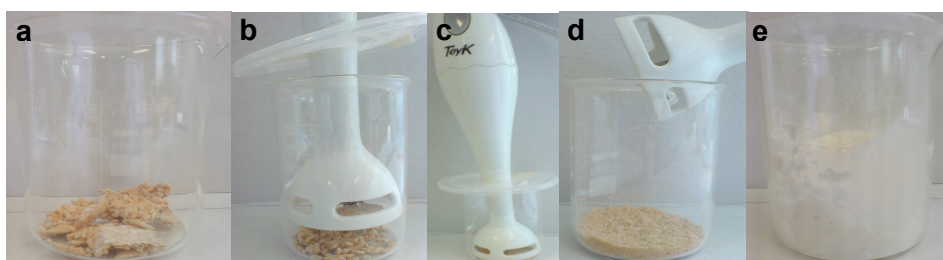


FIGURA 10 – PROCESSOS DE TRITURAÇÃO DO SUBSTRATO COLONIZADO POR *Clonostachys rosea* E DE ADIÇÃO DE AMIDO DE MILHO

(a) Substrato colonizado antes do processo de trituração; (b) e (c) sistema utilizado na trituração; (d) substrato colonizado e triturado; (e) substrato colonizado, triturado e misturado com amido de milho (1:4, p/p)

Após o processo de formulação, todos os tampões dos erlenmeyers foram removidos e os frascos foram fechados com um pedaço de parafilme (Parafilm M[®]). A seguir, cada erlenmeyer foi envolto com um pedaço de papel alumínio.

4.3.7.3 Armazenamento

Após a formulação, procedeu-se o acondicionamento dos erlenmeyers. Os erlenmeyers de cada fermentação e formulação foram divididos em duas partes e cada parte foi acondicionada em uma das duas condições de armazenamento testadas:

- frio (F): armazenamento em geladeira, a 4 °C e
- temperatura ambiente (A): armazenamento dentro de um armário em sala sem controle de temperatura (Fig. 9).

4.3.7.4 Amostragem

As avaliações dos tratamentos foram feitas nos seguintes pontos:

- após o período de fermentação;
- após a etapa de secagem lenta (somente para a FES-1);
- após o processo de formulação dos esporos;
- após 15 dias de armazenamento;
- após 30 dias de armazenamento;
- após 60 dias de armazenamento;
- após 90 dias de armazenamento;
- após 120 dias de armazenamento e
- após 150 dias de armazenamento.

Em cada ponto de amostragem foi coletado um erlenmeyer de cada tratamento (Fig. 9, lado direito). Para cada frasco foi feita a contagem dos esporos para avaliar a produção, o teste de germinação para avaliar a viabilidade dos esporos, o teste de eficácia dos esporos por titulação e o teste de eficácia dos esporos em maçãs.

4.4 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA E DE EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Clonostachys rosea*

4.4.1 Fermentação líquida de superfície do fungo *Clonostachys rosea*

No processo de fermentação líquida de superfície (FLS), o inóculo de um fungo é misturado uniformemente ao meio de cultivo mas, visto que o fungo é aeróbio e a fermentação é estática, a biomassa do fungo se desenvolve como uma massa compacta que flutua na superfície do líquido.

O efeito do teor inicial de glucose no crescimento micelial e na produção de EPS foi testado em duas concentrações nominais diferentes: 10 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹. Estas FLS foram feitas em frascos de erlenmeyer (500 mL) contendo Meio Mínimo, composto por 85 mL de água destilada, 0,6 g NaNO₃, 0,15 g KH₂PO₄, 0,05 g KCl, 0,05 g MgSO₄·7H₂O, 0,001 g FeSO₄, 0,001 g ZnSO₄ e uma alíquota de 15 mL de uma solução aquosa de glucose, calculado para fornecer a concentração final desejada. Optou-se pela utilização do Meio Mínimo com a finalidade de evitar possíveis interferências do amido presente em outros meios. Nestes experimentos, a cada tempo de amostragem foram coletados três frascos para avaliação.

A FLS para a produção de polissacarídeos da biomassa e de EPS pelo fungo *C. rosea* durou 21 dias e utilizou 47 frascos de erlenmeyer (2000 mL). Cada frasco continha Meio Mínimo, composto por 240 mL de água destilada com os sais e 2,5 g de glucose dissolvidas em 10 mL de água destilada (para fornecer uma concentração final de glucose de 10 g L⁻¹).

Em todas as fermentações, a solução de sais e a solução de glucose foram autoclavadas separadamente a 121 °C por 15 min, então uma das soluções de glucose foi adicionada assepticamente a cada um dos frascos. O preparo do inóculo de *C. rosea* foi feito de acordo com o protocolo descrito na seção 4.2, sendo que cada frasco de erlenmeyer de 500 mL foi inoculado com 5 mL e cada frasco de erlenmeyer 2000 mL com 12,5 mL de inóculo. A seguir, os frascos foram incubados, sem agitação, a 24 °C e 24 h de luz.

4.4.2 Análises das fermentações de *Clonostachys rosea* feitas em frascos de erlenmeyer de 500 mL

A biomassa foi removida da cultura por filtração a vácuo, através de papel filtro Qualy[®], e submetida à secagem em estufa até peso constante a 60 °C para determinação da massa seca. Uma alíquota de 0,5 mL do filtrado foi estocada a -18 °C para determinação posterior da concentração residual de glucose através do Método da Glucose Oxidase (Glucose GOD-PAP- Kovalent do Brasil Ltda). Em seguida, foram adicionados 3 volumes de etanol gelado (3:1; v/v) ao restante do filtrado. Esta solução foi colocada em repouso em uma câmara fria (4 °C) por 24 horas. O polissacarídeo precipitado (EPS) foi separado através de centrifugação (7660×g por 15 min, 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. Na sequência, o EPS foi dialisado contra água corrente por 24 horas (membrana de 8 kDa de exclusão) e a fração retida na membrana foi liofilizada e pesada. Nos gráficos os resultados são apresentados como média das triplicatas ± erro padrão. Nos casos em que as barras de erro não aparecem, considera-se que os erros foram menores que os tamanhos dos símbolos utilizados nos gráficos.

4.4.3 Extração aquosa dos polissacarídeos da biomassa e purificação dos polissacarídeos da biomassa e dos exopolissacarídeos

No 21º dia da FLS feita em frascos de 2000 mL a biomassa foi separada do meio de cultivo por filtração a vácuo, utilizando papel filtro Qualy[®]. A Figura 11 mostra o esquema de extração e purificação dos polissacarídeos da biomassa e dos EPS.

A biomassa filtrada (23,9 g massa seca) foi deslipidificada e despigmentada com CHCl₃–MeOH (2:1 v/v, 600 mL, 25 °C, por 24 h, extraída 2×) e o material residual foi extraído com água (300 mL, 100 °C, por 6 h, extraído 14×). Os extratos aquosos foram unidos e essa fração foi precipitada com etanol gelado (3:1; v/v), centrifugada (15 min, 7660×g, 4 °C) e dialisada contra água corrente por 48 horas (membrana de 8 kDa *cut-off*).

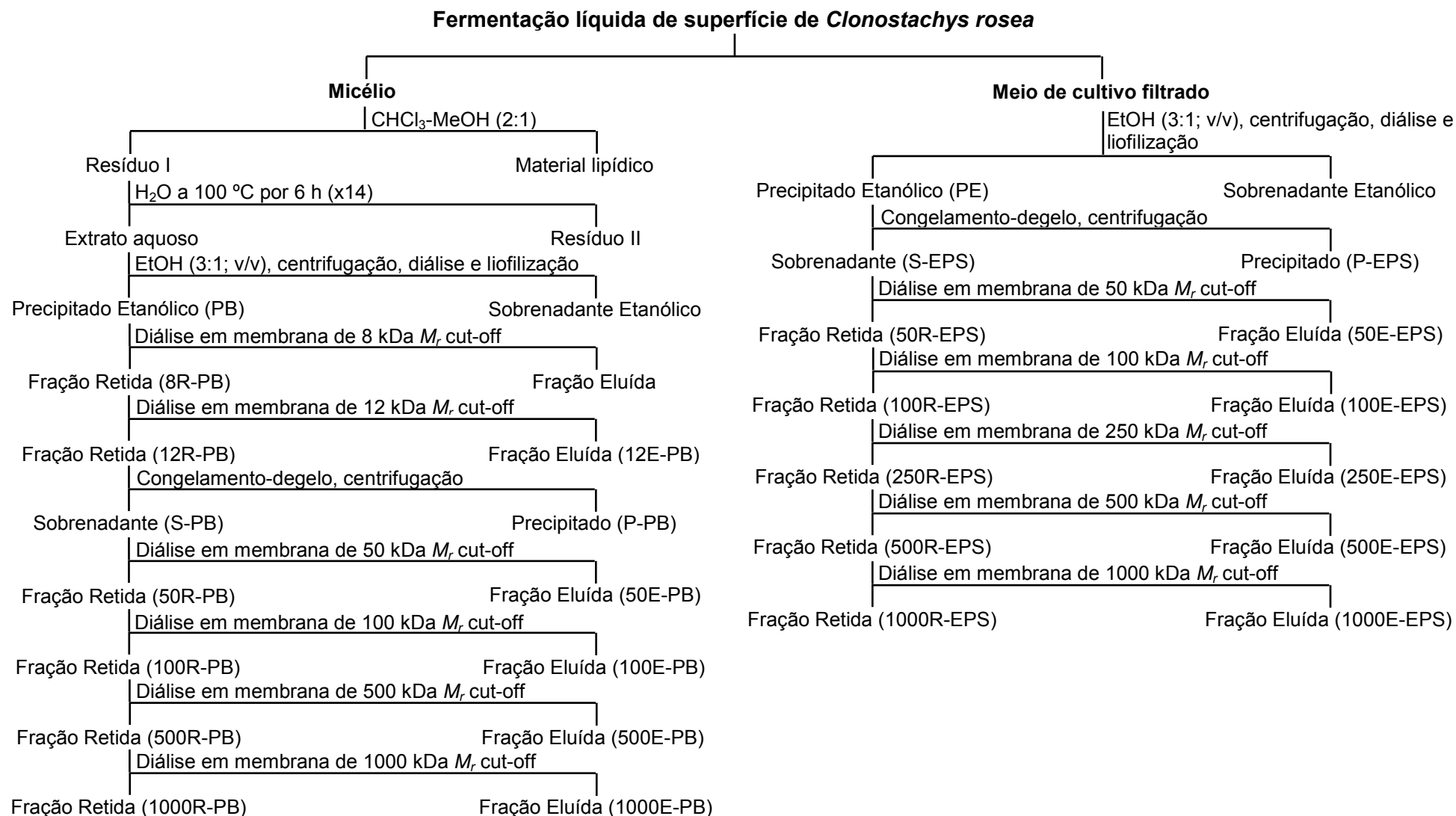


FIGURA 11 – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA E DOS EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Clonostachys rosea*

O material retido foi congelado e liofilizado, fornecendo os polissacarídeos da biomassa (PB = 1,68 g). A fração PB foi dissolvida em água destilada e dialisada novamente através de uma membrana de 8 kDa *cut-off* e, na seqüência, de uma membrana de 12 kDa *cut-off*, para remover componentes de baixa massa molecular.

O processo de congelamento e degelo da amostra retida na membrana de 12 kDa (12R-PB) forneceu uma fração precipitada (P-PB) e uma fração sobrenadante (S-PB), as quais foram separadas por centrifugação (15 min, 7660×g, 4 °C). A fração S-PB foi então purificada pelo processo de diálise fechada através de uma série de membranas com diferentes limites de exclusão (50, 100, 500 e 1000 kDa *cut-off*, Spectra-Por® Biotech Polyvinilidene Difluoride (PVDF)), fornecendo frações eluídas (50E-PB, 100E-PB, 500E-PB e 1000E-PB, respectivamente) e frações retidas (50R-PB, 100R-PB, 500R-PB e 1000R-PB, respectivamente).

Após remoção da biomassa por filtração, o EPS no meio de cultura filtrado (9,9 L) foi precipitado, utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente para as culturas feitas em frascos de 500 mL, dando origem a fração PE (7,34 g). O material liofilizado foi dissolvido em água e submetido ao processo de congelamento-degelo, o qual forneceu uma fração precipitada (P-EPS) e uma fração sobrenadante (S-EPS), as quais foram separadas por centrifugação (15 min, 7660×g, 4 °C). A fração S-EPS foi então purificada por processo de diálise, através de membranas com diferentes limites de exclusão (50, 100, 250, 500 e 1000 kDa *cut-off*, Spectra-Por® Biotech Polyvinilidene Difluoride (PVDF)), fornecendo frações eluídas (50E-EPS, 100E-EPS, 250E-EPS, 500E-EPS e 1000E-EPS, respectivamente) e frações retidas (50R-EPS, 100R-EPS, 250R-EPS, 500R-EPS e 1000R-EPS, respectivamente).

Nos procedimentos de diálise fechada, tanto da purificação do polissacarídeo da biomassa quanto do exopolissacarídeo, cada fração foi mantida em diálise sob agitação magnética durante 24 h. Após esse período, uma amostra da água de diálise foi submetida à avaliação da presença de carboidratos através do Método de Fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Nas reações positivas a água de diálise foi trocada e a fração foi submetida a mais uma diálise fechada. O processo foi interrompido somente quando a água de diálise apresentou reação negativa para carboidratos. A seguir, a fração retida em cada membrana foi dialisada utilizando a próxima membrana de maior *cut-off*.

4.4.4 Extração alcalina e purificação dos polissacarídeos da biomassa

O micélio residual da extração anterior (Resíduo II, Fig. 11) foi tratado com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH 2%) sob refluxo em banho com água fervente durante 6 h, na presença de boroidreto de sódio (NaBH_4) para evitar degradação das cadeias polissacarídicas. Este processo de extração foi repetido três vezes, sendo que as frações obtidas foram reunidas e denominadas de K2. Este extrato alcalino (K2) foi neutralizado com ácido acético glacial. Visto que ocorreu precipitação após adição do ácido, a mistura foi centrifugada (15 min, $7660\times g$, 4 °C) e o material precipitado (P-K2) e o sobrenadante (S-K2) foram dialisados através de membranas de 12 kDa *cut-off*. O material retido na diálise da fração S-K2 foi submetido ao procedimento de purificação por congelamento-degelo, dando origem à fração solúvel em água fria (SS-K2) e à insolúvel em água fria (PS-K2).

4.4.5 Análise Estrutural dos Polissacarídeos

4.4.5.1 Composição Monossacarídica

Alíquotas das frações dos polissacarídeos da biomassa e dos EPS (~ 1 mg) foram submetidas à hidrólise ácida total utilizando 1,0 mL de TFA (ácido trifluoroacético) 1 M, durante 8 horas a 100 °C. Após este tempo, o ácido foi eliminado das amostras hidrolisadas por evaporação à secura. A seguir, os produtos hidrolisados foram derivatizados (processo de redução e acetilação). Para isso, os produtos de hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH_4) em temperatura ambiente, pH 9-10, por 15 horas (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Após este período, as soluções reduzidas foram tratadas com resina catiônica (pH 7,0). A solução resultante foi filtrada e levada à secura sob pressão reduzida. O ácido bórico formado foi eliminado por co-evaporação com metanol, na forma de borato de trimetila.

Os alditóis formados foram então acetilados com uma mistura de anidrido acético (Ac_2O) / piridina [1:1 (v/v)] *overnight* a temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). O processo foi interrompido por adição de gelo e o material acetilado foi extraído com clorofórmio. A piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida por sucessivas lavagens deste extrato com uma solução de sulfato de cobre (5%). Após remoção total da piridina, a fração clorofórmica foi filtrada por algodão. Após secura, os acetatos de alditóis obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) em um Cromatógrafo Gasoso Varian, modelo 3800, acoplado a Espectrômetro de Massa Saturn 2000R, utilizando coluna DB-225 (30 m x 0,25 mm). Durante a injeção da amostra, a temperatura foi de 50 °C, sendo então programada para aumentar 40 °C min^{-1} até atingir a temperatura constante de 220 °C. Hélio foi usado como gás de arraste.

4.4.5.2 Determinação de Homogeneidade

As amostras das frações dos polissacarídeos do micélio e dos EPS foram solubilizadas em NaNO_2 0,1 M e ultrafiltradas em membranas de éster de celulose (MILLIPORE, tamanho dos poros de 0,22 μm). Em seguida foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz em multiângulos WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP-F. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS em série com limites de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , 5×10^3 . O eluente utilizado, NaNO_2 0,1 M com NaN_3 a 0,02% (m/v), foi administrado na coluna através de uma bomba peristáltica WATERS 515 com fluxo de 0,6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

4.4.5.3 Análise de Metilação

A metilação das frações polissacarídicas 1000E-PB e 1000E-EPS foi realizada segundo Ciucanu e Kerek (1984), onde 2 mg de cada amostra foram solubilizadas em 0,5mL de dimetilsulfóxido (Me_2SO), sendo, após completa dissolução, adicionadas de NaOH pulverizada (em excesso) e 0,5 mL de iodeto de metila (CH_3I). A mistura reacional permaneceu sob agitação (em vórtex) durante 30 min sendo, posteriormente, mantida em repouso durante 18 horas. Após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de água e gelo ao sistema. A solução foi neutralizada com ácido acético e a amostra metilada foi extraída com clorofórmio. A fase clorofórmica foi evaporada e o material metilado foi pré-hidrolisado com H_2SO_4 72% (v/v; 0,25 mL) por 1 h em banho de gelo, seguido pela diluição com adição de 2 mL de água destilada e aquecimento a 100 °C por 20 h (SAEMAN *et al.*, 1954). Após hidrólise, as soluções foram neutralizadas com BaCO_3 , reduzidas com NaBD_4 e acetiladas. Os alditóis acetatos parcialmente metilados foram analisados por CG-EM e identificados pelo tempo de retenção e perfil dos fragmentos de massa (SASSAKI *et al.* 2005a; PRIETO *et al.* 2007).

4.4.5.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN- ^{13}C , RMN- ^{13}C -DEPT, RMN- ^1H , HMQC e COSY foram adquiridos em aparelho BRUKER 400 MHz, modelo DRX Avance, a 50 °C, com ressonância em 100,63 MHz (para ^{13}C) e 400 MHz (para ^1H). As amostras foram solubilizadas em D_2O ou $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ ppm, baseando-se no padrão interno de acetona (δ 30,2 e δ 2,22 no ^{13}C e ^1H , respectivamente).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são apresentados em duas seções. A primeira trata dos estudos referentes ao desenvolvimento de uma formulação para os esporos de *C. rosea*. Na segunda seção são apresentados os estudos para caracterizar quimicamente os polissacarídeos extraídos do micélio e os exopolissacarídeos de *C. rosea*.

5.1 DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO PARA OS ESPOROS DE *Clonostachys rosea*

Em Agosto de 2005 foi encontrada uma empresa (Natural Rural) que produz e comercializa um produto de biocontrole a base de *C. rosea*, denominado Clonostat PM[®]. O produto foi adquirido para realizar um teste de viabilidade de esporos visando avaliar sua qualidade. Este teste consistiu de um experimento simples de germinação, de acordo com as orientações disponíveis na bula do produto. Como controle, foi feita uma placa de Petri inoculada com *C. rosea* (cepa GP04) que é o foco desta tese (Fig. 12).

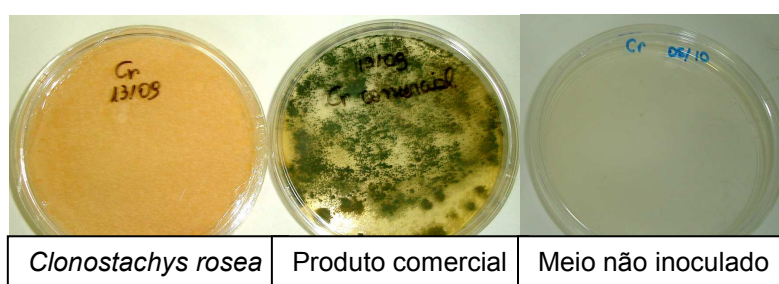


FIGURA 12 – COMPARAÇÃO DO TESTE DE GERMINAÇÃO DO PRODUTO COMERCIAL CLONOSTAT PM[®] E DO ISOLADO EM ESTUDO

Como pode ser observada na Figura 12, a placa controle apresentou alto grau de esporulação na cor rósea, característica do fungo *C. rosea*. Ao contrário, na placa inoculada com o produto comercial Clonostat PM[®] pode-se observar alto grau

de contaminação, sem sinal visível da presença de *C. rosea*. Ambas podem ser comparadas com a placa contendo somente o meio de cultivo BDA não inoculado, essencialmente incolor.

Para confirmar essa análise preliminar, uma amostra do produto foi encaminhada para análise na EMBRAPA – Uva e Vinho, sob orientação da Dr^a. Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza, que trabalha com o fungo *C. rosea*. Três amostras do produto foram analisadas e os organismos encontrados em cada amostra foram determinados (Tab. 2).

TABELA 2 – ANÁLISE DA QUALIDADE DO PRODUTO CLONOSNAT PM^{®*}

Amostras	Organismos isolados (ufc) **		
	<i>C. rosea</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	Bactérias e leveduras***
1	0	20	440
2	0	5	575
3	0	5	322

* Análise feita pela EMBRAPA – Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS) em Dezembro de 2005.

** ufc = Unidade Formadora de Colônia

*** o número de espécies diferentes encontradas não foi informado

Conclui-se que a amostra analisada não continha o ingrediente ativo que constava na descrição do produto (500 milhões de esporos de *C. rosea* por grama de produto), ao contrário, apresentou *Trichoderma* sp. em pequenas quantidades, organismo que também é utilizado como antagonista de alguns fungos, e uma alta concentração de bactérias e leveduras. É necessário ressaltar que este produto é comercializado livremente e que o fabricante destaca que ele é próprio para uso na produção orgânica conforme a legislação vigente.

A péssima qualidade desse produto comercial enfatizou a urgência de desenvolver um produto com base nos esporos de *C. rosea* realmente eficiente.

Devido a isso, os estudos deste trabalho abrangeram todas as etapas para o desenvolvimento de um produto de biocontrole com base nos esporos de *C. rosea*:

- fermentação em estado sólido (FES) – para produção dos esporos do agente de biocontrole;
- secagem lenta – processo utilizado para reduzir a umidade do ingrediente ativo antes do processamento e da adição do carreador;
- formulação – envolve processos de transformação física do material e adição de carreadores (material inerte);
- armazenagem – manutenção do produto (germinação e eficácia dos esporos) ao longo do tempo em condições diversas (refrigeração ou ambiente).

No entanto, antes de testar o processo completo, foram feitos experimentos preliminares para definição e padronização dos protocolos, descritos nas seções subseqüentes. Dentre estes experimentos, destaca-se o desenvolvimento de três testes para avaliar os esporos de *C. rosea* após a fermentação e a formulação, e durante o armazenamento – um teste de germinação dos esporos (viabilidade) (Seção 5.1.1) e dois testes de eficácia dos esporos contra *B. cinerea* (Seções 5.1.2 e 5.1.3).

5.1.1 Teste de germinação de esporos de *Clonostachys rosea* para avaliar a viabilidade de forma quantitativa

Na literatura a viabilidade dos esporos de *C. rosea* é determinada de diferentes maneiras: (1) através da medida da esporulação por porcentagem de área dos tecidos vegetais colonizada pelo fungo (SUTTON *et al.*, 2002), (2) pela estimativa da densidade do inóculo através da contagem das colônias (PENG, SUTTON, KEVAN, 1992), (3) por contagem direta do número de colônias desenvolvidas em placas de petri (DALL'ONDER, 1997; JENSEN; KNUDSEN; JENSEN, 2002), e (4) por contagem de esporos germinados em placas contendo BDA (KRAUSS; SOBERANIS, 2002; SUTTON *et al.*, 2002).

Além da maioria dos testes não fornecer uma estimativa da porcentagem de germinação de esporos de *C. rosea*, aqueles que apresentam resultados em

porcentagem de germinação (item 4) não fornecem uma descrição detalhada do protocolo utilizado (por exemplo, a concentração da solução de esporos de *C. rosea*, a necessidade de realizar diluições dessa solução, a quantidade de solução de esporos colocada em cada placa e as condições de incubação das placas – tempo, temperatura e luminosidade), dificultando assim a realização do experimento. Portanto, foi necessário desenvolver um teste que pudesse prover esses dados de maneira confiável. Após testes preliminares com vários sistemas (resultados não mostrados), o teste de germinação por Deposição de Gota sobre Lâmina foi selecionado, devido à facilidade de execução do método e de avaliação dos resultados.

Inicialmente, foi necessário determinar o tempo de incubação a ser usado no teste de Deposição de Gota sobre Lâmina, uma vez que a literatura não apresenta uma informação específica sobre o tempo de germinação dos esporos de *C. rosea*, com tempos variando entre 10 e 16 h em meio BDA sendo relatados para sistemas em placas de Petri (KRAUSS; SOBERANIS, 2002; SUTTON *et al*, 2002). Assim, foi feito um teste preliminar de germinação de esporos de *C. rosea* para determinar a forma básica da cinética de germinação (Fig. 13). Notou-se que a porcentagem de germinação aumentou ao longo do tempo de maneira não linear, alcançando uma germinação de 96% após 9,5 h.

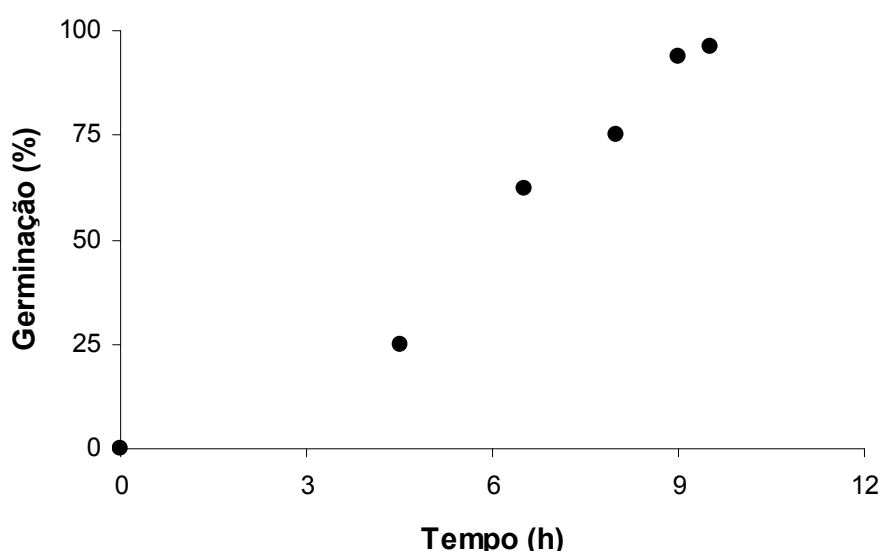


FIGURA 13 – TESTE PRELIMINAR DE CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea* EM MEIO DE CULTIVO BDA

Visto que Francisco *et al* (2006) e Reis e Richter (2007) relataram que o meio de cultivo utilizado pode afetar a velocidade e o tempo de germinação dos esporos, foi feito um teste mais acurado para avaliar a cinética de germinação utilizando dois meios de cultivo distintos: um meio nutricionalmente rico – BDA e um meio pobre – ágar-água (Fig. 14), com intuito de determinar o tempo de cultivo necessário para a germinação de 100% dos esporos.

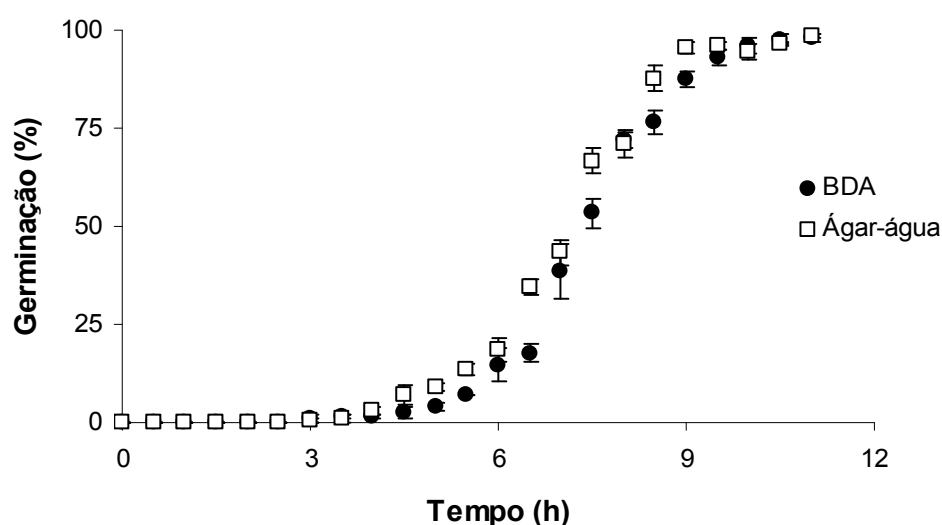


FIGURA 14 – CINÉTICA DE GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Clonostachys rosea* UTILIZANDO DOIS MEIOS DE CULTIVO NUTRICIONALMENTE DIFERENTES: BDA (MEIO RICO) E ÁGAR-ÁGUA (MEIO POBRE)

Não houve diferença significativa na cinética de germinação utilizando os dois tipos de meio de cultivo. Baseado nestes resultados, um tempo de 12 h, suficiente para garantir que todos os esporos viáveis germinem, e o meio de cultivo BDA foram escolhidos para a aplicação deste método nos experimentos futuros.

5.1.2 Teste de eficácia dos esporos em placas

A viabilidade dos esporos de *C. rosea*, como parâmetro isolado, não é suficiente para garantir o sucesso de um produto de biocontrole, visto que muitos esporos poderiam germinar e morrer ou germinar e não apresentar virulência. Devido a isso, torna-se necessário avaliar a eficácia dos esporos, isto é, a capacidade dos esporos em controlar o agente causador da doença.

Um fator importante a ser considerado é a impraticabilidade de realizar testes de campo, sendo assim, os testes de eficácia dos esporos de *C. rosea* neste trabalho foram limitados a procedimentos de laboratório. Por outro lado, é interessante ter um teste de laboratório mais simples e, muitas vezes mais econômico, para utilizar.

Os testes relatados na literatura para avaliar a eficácia dos esporos de *C. rosea* na supressão de *B. cinerea* utilizam material vegetal, como folhas, pétalas e estames de morangueiro (PENG e SUTTON, 1991, DALL'ONDER, 1997), hastes e folhas de tomateiro (SUTTON *et al.*, 2002). A reprodutibilidade destes testes não pode ser garantida, uma vez que a qualidade do material vegetal pode variar de lote para lote.

Assim, resolveu-se adaptar o Teste de Titulação Viral, que é uma metodologia utilizada para testar a eficácia de vacinas (anticorpos) contra vírus, para testar a eficácia de *C. rosea*. Para isso, nos pontos de avaliação, foi feita a extração dos esporos do substrato colonizado para cada tratamento e, após determinação da concentração de esporos nas soluções obtidas, cada uma delas foi diluída sequencialmente, fornecendo soluções com concentrações que variaram de 10^7 até 10^3 esporos/mL. Para cada concentração, uma placa de Petri contendo BDA foi inoculada de forma pontual em 4 áreas com 0,01 mL de suspensão de esporos. Após incubação por 24 h, a 24 °C e 24 h de luz, as placas foram inoculadas com uma solução de esporos de *B. cinerea* 10^6 esporos/mL (0,01 mL de suspensão de esporos sobre cada ponto em cada uma das placas contendo as diferentes diluições de *C. rosea*). As placas foram incubadas novamente nas mesmas condições e mantidas sob observação.

O objetivo do teste de titulação foi encontrar o *titer*, isto é, a menor concentração de esporos de *C. rosea* capaz de reprimir totalmente o crescimento de *B. cinerea* nos quatro pontos de inoculação de uma placa (Fig. 15). O *titer* foi expresso como o expoente da concentração de esporos de *C. rosea* na solução que foi inoculado naquela placa. Assim, quanto menor o *titer*, mais eficaz é a solução-mãe de *C. rosea* no controle de *B. cinerea*.

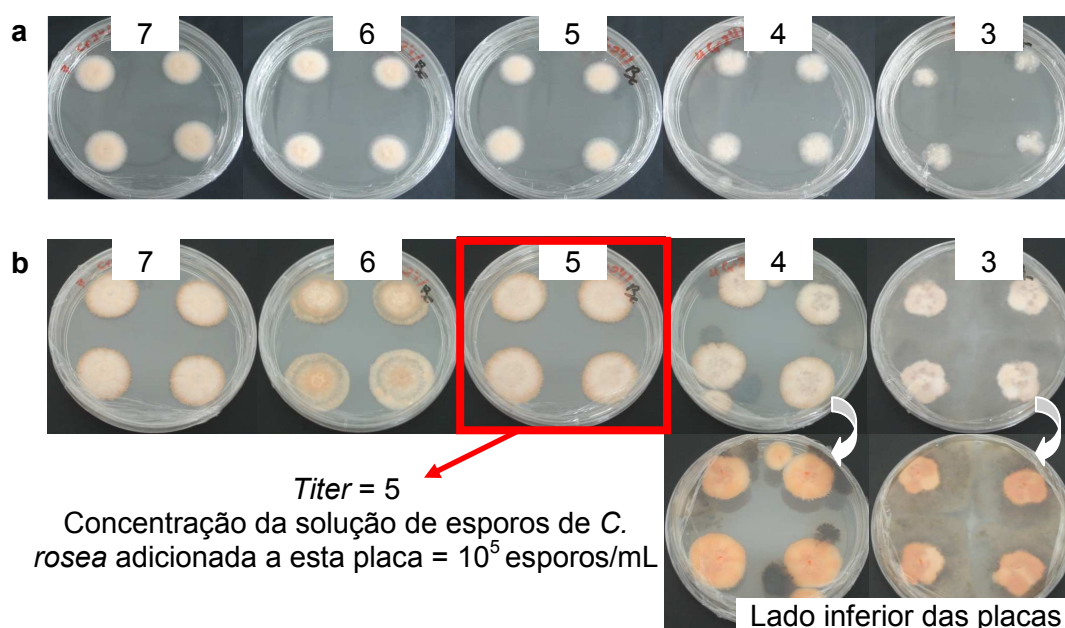


FIGURA 15 – TESTE PRELIMINAR DE TITULAÇÃO DE *Clonostachys rosea* CONTRA *Botrytis cinerea*

(a) Placas de Petri com titulação de *C. rosea* entre 7 e 3, correspondente a diluições sequenciais da solução-mãe de esporos de *C. rosea*, após 24 h de incubação. Os números correspondem ao expoente da concentração de esporos da solução adicionada a cada placa. Portanto, neste experimento preliminar, as concentrações das soluções variaram de 10^7 até 10^3 esporos/mL; b) Placas de Petri com titulação de *C. rosea* entre 7 e 3 inoculadas com *B. cinerea*, após 1 semana de incubação. O fungo *B. cinerea* se desenvolveu apenas nas placas com titulação de *C. rosea* de 3 e 4 (o lado inferior dessas duas placas é mostrado para facilitar a visualização do desenvolvimento de *B. cinerea*).

Espera-se que no início do processo (após a formulação) a eficácia dos esporos de *C. rosea* seja elevada e que, mesmo em concentrações baixas de seus esporos, o fungo *B. cinerea* não consiga se desenvolver. Durante o armazenamento tanto o número de esporos viáveis quanto a eficácia dos esporos de *C. rosea* pode diminuir e, com isso, espera-se que o fungo *B. cinerea* se desenvolva até mesmo nas concentrações mais elevadas de *C. rosea*, aumentando assim o *titer*. Em uma

situação prática, isso permitiria prever qual a quantidade de produto formulado de *C. rosea* seria necessária para conseguir suprimir o patógeno após um determinado período de armazenamento.

Pode-se notar na Figura 15 que, para uma suspensão de esporos de *C. rosea* preparada a partir de um cultivo de 8 dias em placas contendo BDA, a concentração de 10^5 esporos/mL inibiu o crescimento de *B. cinerea*. Com esse resultado, o *titer* da solução-mãe de esporos de *C. rosea* foi 5. Isso demonstra que a solução-mãe diluída até 10^5 esporos/mL ainda foi capaz de suprimir totalmente o fungo *B. cinerea* na placa do experimento de titulação. Entretanto, quando a solução-mãe foi mais diluída (10^3 e 10^4 esporos/mL), ela não conseguiu suprimir o desenvolvimento de *B. cinerea*. Baseado na eficiência desta metodologia na avaliação da eficácia dos esporos de *C. rosea*, este teste foi escolhido para a aplicação nos experimentos futuros.

5.1.3 Teste de eficácia dos esporos em maçãs

Além do teste de eficácia dos esporos de *C. rosea* por titulação em placas, foi feito um outro teste de eficácia – em laboratório – para avaliar diretamente a proteção de frutas em pós-colheita. Testes preliminares foram feitos utilizando morangos, que foram inoculados primeiramente com *C. rosea* e, 24 horas depois, com *B. cinerea* (procedimento similar ao teste de titulação). Entretanto, muitos morangos apodreceram devido à ação de outros fungos, mesmo nos tratamentos controle (frutos não inoculados), dificultando a avaliação do controle do mofo cinzento (resultados não mostrados). Devido a estas dificuldades e com base no trabalho de Batta (2004), optou-se por substituir os morangos por maçãs no teste.

Assim, como foi explicado na seção 4.3.6, em cada avaliação foi feita a extração dos esporos de *C. rosea* dos produtos formulados em todos os tratamentos. Após a determinação da concentração de esporos nas soluções obtidas, elas foram ajustadas para 10^7 esporos/mL. Na sequência, os esporos de *C. rosea* foram inoculados em dois furos próximos ao pedicelo de cada maçã, 24 h

antes da inoculação de *B. cinerea* nos mesmos lugares. Os controles foram feitos inoculando água destilada nos furos em vez de esporos de *C. rosea*.

No teste preliminar, os esporos de *C. rosea* apresentaram um efeito preventivo contra *B. cinerea* nas maçãs perfuradas, uma vez que não apareceram lesões, mesmo depois de duas semanas (Fig. 16A). Em comparação, no tratamento controle com água destilada houve desenvolvimento de lesões típicas do mofo cinzento (Fig. 16B). Com base nestes resultados, optou-se pela utilização deste bioensaio para avaliar a eficácia dos esporos, em conjunto com o teste de titulação, e assim, auxiliar na determinação da vida de prateleira do produto de biocontrole.



FIGURA 16 – BIOCONTROLE DE *Botrytis cinerea* EM MAÇÃS UTILIZANDO *Clonostachys rosea*

(a) Efeito preventivo dos esporos de *C. rosea* contra infecções localizadas de *B. cinerea* (furos) em maçãs; (b) Desenvolvimento das lesões causadas por *B. cinerea* no tratamento controle, com água destilada.

5.1.4 Teste de secagem lenta

No desenvolvimento de um produto de biocontrole, é importante manter os esporos viáveis mas em um estágio dormente. A dormência dos esporos depende das condições ambientais, assim, a chave para prolongar a sobrevivência é evitar a indução dos fatores de germinação e reduzir o metabolismo ao máximo. Isso pode ser obtido através do processo de secagem, técnica muito utilizada na preservação de alimentos, produtos agrícolas e farmacêuticos. Entretanto, materiais biológicos, tal como esporos, podem ser danificados de forma irreversível durante a secagem

devido ao calor e a remoção de água (HORACZEK, VIERNSTEIN, 2004). Assim, a etapa de secagem deve ser planejada cuidadosamente de acordo com as necessidades e as limitações do organismo envolvido no processo.

Além disso, a secagem é utilizada para evitar a proliferação de organismos contaminantes, como bactérias, leveduras e outros fungos nos produtos de biocontrole. De acordo com Jenkins (1998), o ingrediente ativo (esporo) deve ser seco até atingir uma umidade inferior a 5%, para posterior acréscimo do carregador (material inerte) para formulação. No entanto, deve-se ressaltar que as formas de secagem (no ambiente ou em estufas ventiladas) e a temperatura utilizada podem afetar a germinação e a eficácia dos esporos.

A etapa de secagem já foi utilizada em processos de formulação de esporos de *C. rosea* descritos na literatura (MORANDI *et al.*, 2003; JENSEN; KNUDSEN; JENSEN, 2000; 2002; JENSEN *et al.*, 2004) (Tab. 1). Entretanto, os benefícios ou malefícios desta etapa para os esporos não foram determinados. Devido a isso, essa etapa foi aplicada em uma das fermentações para avaliar seu efeito na germinação e na eficácia dos esporos de *C. rosea* em comparação com as fermentações que não passaram pela secagem. Com base nas informações da literatura, foi escolhido para este trabalho um processo de secagem lenta em estufa com ventilação, a 30 °C por 7 dias.

Para selecionar um método de fechamento dos erlenmeyers durante o período de secagem pós-cultivo que proporcionasse uma secagem suficientemente rápida, foi feita a comparação entre a secagem de frascos fechados com tampões de algodão e a secagem de frascos fechados com vários tipos de papel. Nesse experimento o preparo dos erlenmeyers foi feito como se fosse para uma FES padrão, isto é, os frascos foram fechados com tampões de algodão e gaze. Entretanto, ao invés de inocular cada erlenmeyer com uma solução de esporos de *C. rosea*, foi adicionada a mesma quantidade de água e procedeu-se à etapa de secagem. Foram testadas cinco diferentes formas de fechamento:

- ➔ tampões de algodão e gaze (padrão utilizado durante a FES);
- ➔ papel higiênico folha simples;
- ➔ papel higiênico folha dupla;
- ➔ papel toalha;
- ➔ papel filtro.

Os tratamentos onde foram utilizados papéis para o fechamento dos erlenmeyers apresentaram variações semelhantes do teor de umidade, com diminuição acentuada do teor de água, decaindo de aproximadamente 47% para 5% (p/p base úmida) em média, em 6 dias (Fig. 17). Ao contrário, o tratamento onde os erlenmeyers permaneceram com tampão de algodão e gaze durante a secagem apresentou uma diminuição do teor de água menos acentuada, chegando a um teor de 26% (p/p base úmida) no mesmo período.

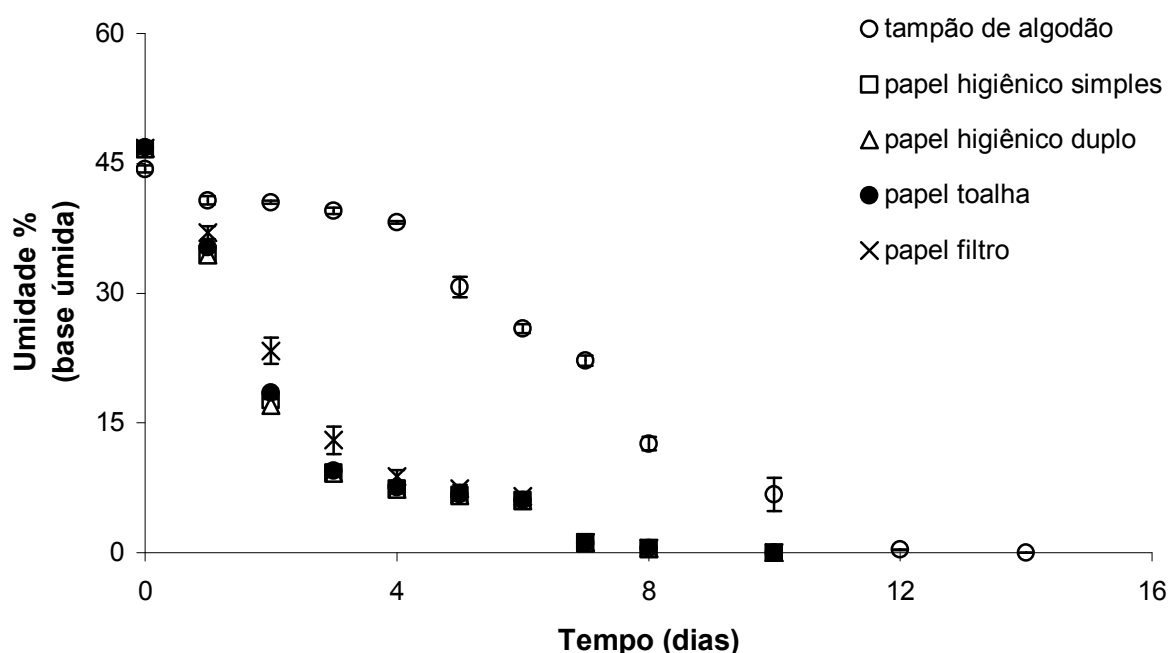


FIGURA 17 – VARIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ÁGUA EM ERLENMEYERS FECHADOS DE CINCO FORMAS DIFERENTES, SUBMETIDOS À SECAGEM LENTA EM ESTUFA, 30 °C, POR 7 DIAS

Sendo assim, ao utilizar papel para fechar os erlenmeyers durante o processo de secagem, o substrato fermentado atinge a umidade requerida para a formulação (5% de umidade) em 6 dias. Ao contrário, se o tampão de algodão e gaze que foi usado durante a fermentação for mantido, isso só ocorre após 10 dias. Assim, determinou-se que, no experimento posterior de estudo de formulações, após o período de FES estabelecido, o tampão de algodão e gaze dos erlenmeyers deve ser trocado por um pedaço de papel higiênico simples (opção de menor custo) para realizar a etapa de secagem a 30 °C por 7 dias.

5.1.5 Experimento completo de formulação dos esporos de *Clonostachys rosea* - Planejamento

Após realizar os experimentos preliminares, foi realizado um teste completo de formulação para os esporos de *C. rosea*, incluindo as etapas de fermentação, secagem, estudos de formulação e de armazenamento (Fig. 9). Inicialmente foram feitas 3 fermentações em estado sólido (FES-1, FES-2 e FES- 3) de 15 dias de duração. Este tempo de cultivo foi determinado em um experimento preliminar que avaliou formulações feitas após fermentações de 15 e 30 dias e que não mostrou diferença significativa na sobrevivência de esporos pós-fermentação (resultados não mostrados).

Os erlenmeyers das FES-1 e FES-2 foram fechados com tampões de algodão e gaze. Ao contrário, os erlenmeyers da FES-3 foram fechados com pedaços de papel higiênico não esterilizados, visto que Viccini *et al.* (2007) mostraram que este tratamento aumentou a produção de esporos em uma FES de 60 dias de duração.

Somente a FES-1 passou pela etapa de secagem lenta em estufa, onde os tampões de algodão e gaze foram substituídos por pedaços de papel higiênico não esterilizado e os erlenmeyers foram colocados em estufa com ventilação a 30 °C por 7 dias. Ao contrário, após os 15 dias de fermentação, FES-2 e FES-3 foram diretamente para a etapa de formulação. Nota-se que, após os 15 dias de fermentação, FES-1, FES-2 e FES-3, forneceram $2,7 \times 10^9$; $2,7 \times 10^9$ e 2×10^9 esporos por grama de substrato, respectivamente.

Foram testados 3 diferentes processos de formulação para os substratos colonizados provenientes de cada uma das fermentações:

- substrato colonizado intacto – controle (C) (Fig. 18a);
- substrato colonizado triturado (T) (Fig. 18b);
- substrato colonizado triturado e misturado com amido de milho (1:4 p/p) (M) (Fig. 18c).

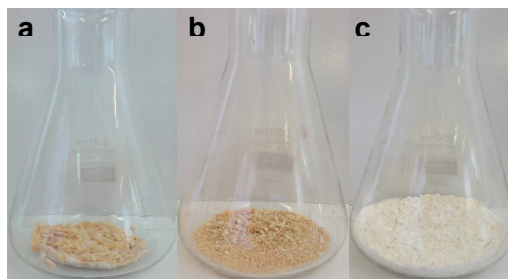


FIGURA 18 – ESTUDOS DE FORMULAÇÃO TESTADOS EM CADA FES

(a) Formulação controle: arroz colonizado por *C. rosea* intacto; (b) Formulação triturada: arroz colonizado por *C. rosea* triturado; (c) Formulação triturada com amido de milho: arroz colonizado por *C. rosea* triturado e, a seguir, misturado com amido de milho (1:4 p/p)

Após a formulação, procedeu-se o acondicionamento dos erlenmeyers em duas condições de armazenamento: frio (F) e temperatura ambiente (A). O experimento completo de formulação (Fig. 9) foi acompanhado através dos testes de germinação e de eficácia dos esporos de *C. rosea* realizados em cada ponto de amostragem para todos os tratamentos, cujos resultados são apresentados nas seções subseqüentes.

5.1.6 Experimento completo de formulação dos esporos de *Clonostachys rosea* - Avaliação da viabilidade dos esporos

5.1.6.1 Comparação entre as fermentações FES-1, FES-2 e FES-3

Visto que é desejável minimizar a perda de viabilidade dos esporos ao longo do armazenamento do produto biológico, inicialmente os resultados são avaliados em termos de velocidade da perda da viabilidade dos esporos.

De forma geral, houve uma tendência de diminuição da viabilidade dos esporos para todos os tratamentos durante o período de armazenamento. Entretanto, em alguns casos este efeito foi atenuado devido a grande variação experimental. Formulações e tratamentos diferentes proporcionaram velocidades distintas de perda de viabilidade dos esporos (Fig. 19).

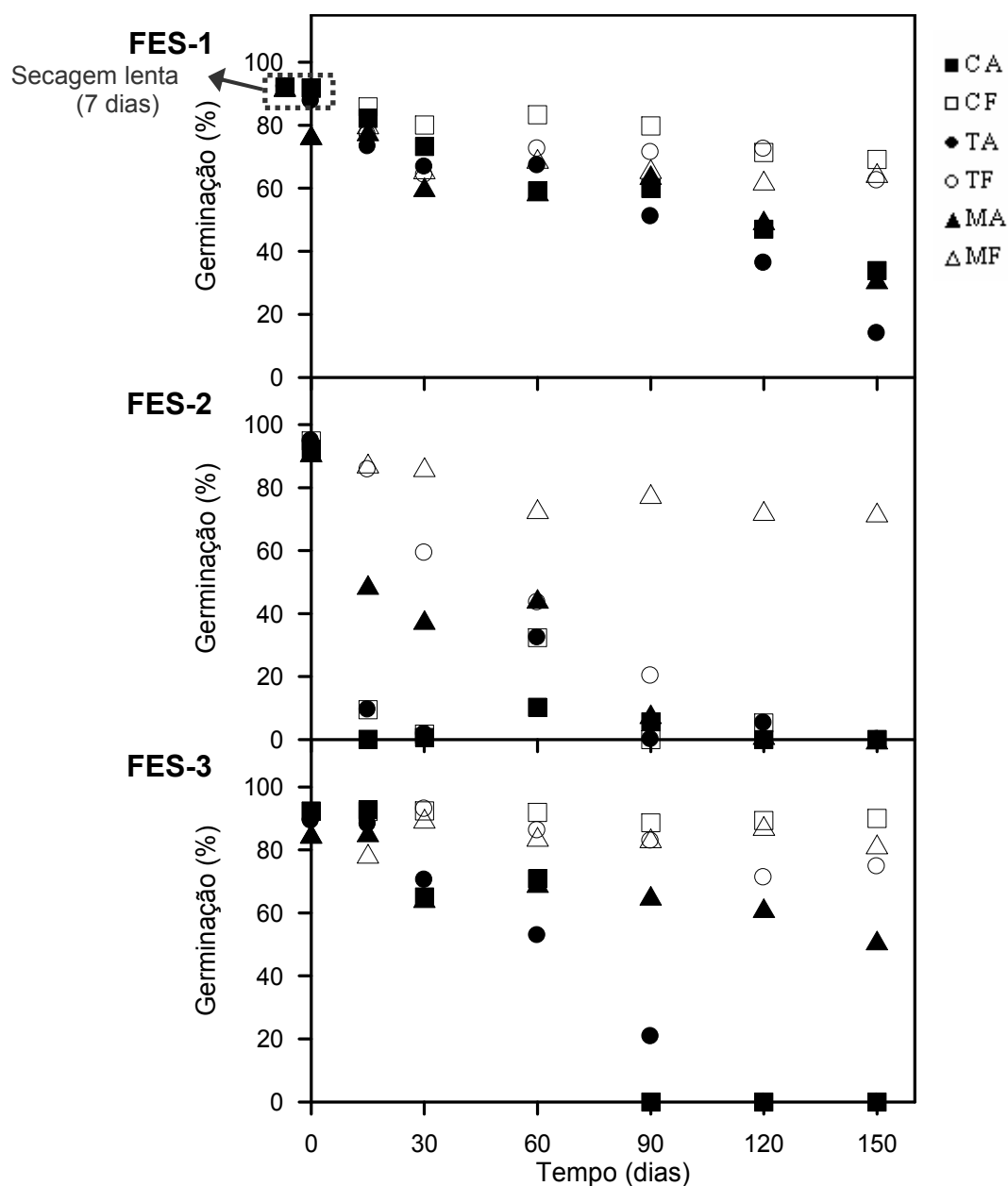


FIGURA 19 – VIABILIDADE DE ESPOROS DE *Clonostachys rosea* NOS TRATAMENTOS DA FES-1, DURANTE O PROCESSO DE SECAGEM LENTA, E NOS TRATAMENTOS DAS FES-1, FES-2 E FES-3, DURANTE O ARMAZENAMENTO

Símbolos: ■ CA (controle armazenado a temperatura ambiente); □ CF (controle armazenado a 4 °C); ● TA (substrato triturado armazenado a temperatura ambiente); ○ TF (substrato triturado armazenado a 4 °C); ▲ MA (substrato triturado misturado com amido de milho armazenado a temperatura ambiente); △ MF (substrato triturado misturado com amido de milho armazenado a 4 °C)

As maiores velocidades de perda de viabilidade ocorreram na FES-2, em relação às outras duas fermentações, especialmente nas armazenagens em temperatura ambiente. Houve também uma grande variação nos resultados, atribuída ao fato de que muitas amostras retiradas para avaliação da viabilidade estavam visivelmente contaminadas por outros microrganismos. Essa contaminação ocorreu devido ao elevado teor de umidade da FES-2, o maior entre as três fermentações, uma vez que nenhum processo de secagem durante ou após a fermentação foi empregado na FES-2. Assim, a atividade de água nos erlenmeyers da FES-2 foi suficientemente alta para permitir o crescimento microbiano.

Além disso, a realização dos procedimentos de trituração para formulação foi prejudicada devido à formação de uma massa úmida compacta de substrato colonizado que ficava aderida ao aparelho de trituração a cada procedimento (para cada erlenmeyer). Deve-se ressaltar que este aparelho não foi esterilizado entre cada trituração, sendo feita apenas uma limpeza com álcool (70%, v/v).

Por outro lado, as menores velocidades de perda de viabilidade dos esporos de *C. rosea* foram observadas nos tratamentos da FES-3, sendo que alguns tratamentos mantiveram uma porcentagem de viabilidade superior a 80% após 150 dias de armazenamento. Os frascos da FES-3 foram fechados com pedaços de papel higiênico não esterilizados durante os 15 dias de FES para promover uma secagem natural do substrato colonizado. Ao final da FES, o aspecto do substrato colonizado da FES-3 foi mais seco que o da FES-2, o que facilitou os procedimentos de trituração do substrato colonizado durante o processo de formulação. Nesta fermentação a contaminação ocorreu somente em alguns erlenmeyers armazenados em temperatura ambiente.

As velocidades de perda de viabilidade dos tratamentos da FES-1 apresentaram um comportamento intermediário entre as outras duas fermentações, com decaimentos progressivos, mas não acentuados, da viabilidade. Os erlenmeyers da FES-1 não apresentaram contaminação por outros microrganismos. Esse fato pode ser atribuído à etapa de secagem lenta, que minimizou a proliferação de eventuais contaminantes.

Foi avaliado ainda o efeito da etapa de secagem lenta sobre a viabilidade dos esporos na FES-1, antes e após a etapa. Notou-se que a viabilidade dos esporos não sofreu alteração após os 7 dias de secagem, mantendo-se em 92%

(Fig. 19). Da mesma forma, a secagem realizada na FES-3, através do uso de tampão de papel higiênico para fechar os erlenmeyers durante a fermentação, também não afetou a germinação inicial (avaliada após a fermentação) em relação às fermentações onde foram utilizados tampões de algodão e gaze – FES-1 e FES-2 (Fig. 19).

5.1.6.2 Efeitos dos processos de formulação e temperaturas de armazenamento - Comparação entre as fermentações FES-1 e FES-3

Devido aos resultados ruins apresentados pela FES-2, a avaliação do efeito dos outros tratamentos, nomeadamente, o tipo de formulação empregada e a condição de armazenamento, não foram contemplados para esta fermentação. Somente os resultados obtidos para FES-1 e FES-3 foram analisados. Para isso, os dados da Figura 19 foram replotados para auxiliar na comparação entre os tratamentos das duas fermentações (Fig. 20).

Comparando os resultados obtidos para FES-1 e FES-3, notou-se que os perfis apresentados para a maioria das formulações foram semelhantes entre si, tanto para os tratamentos armazenados em temperatura ambiente quanto para os armazenados no frio, a 4 °C.

Em FES-1 e FES-3, as três formulações armazenadas a 4 °C (CF, TF e MF) apresentaram declínios pouco acentuados das velocidades de perda de viabilidade em comparação com as formulações armazenadas em temperatura ambiente (CA, TA e MA).

Para FES-1 os melhores tratamentos corresponderam ao controle (C) e ao substrato colonizado triturado misturado com amido de milho (M), com germinação superior a 65% após 150 dias de armazenagem a 4 °C (F). Estes tratamentos (C e M) também apresentaram os melhores resultados em FES-3, entretanto, a germinação foi superior a 80%, nas mesmas condições.

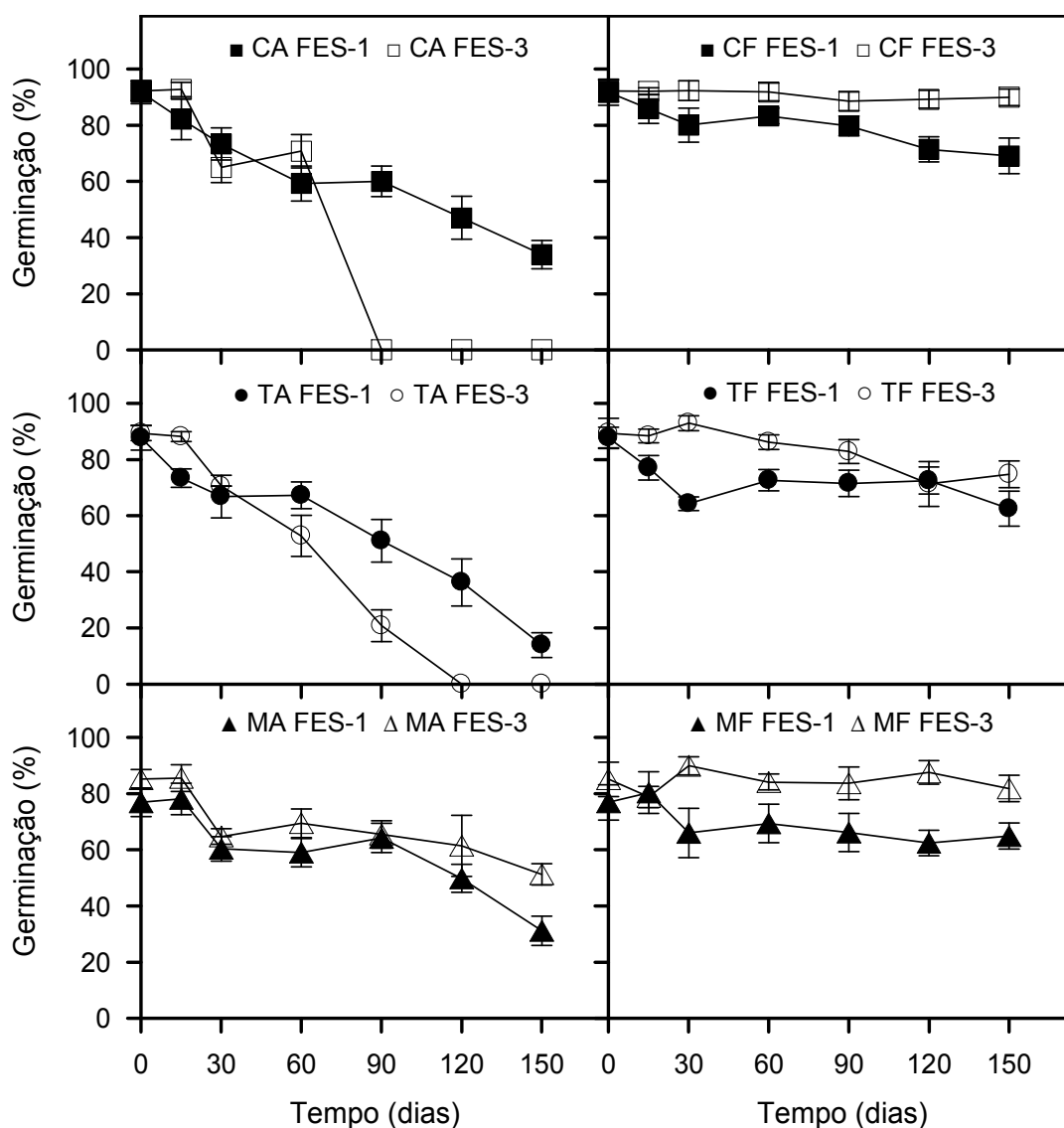


FIGURA 20 – COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO DE FORMULAÇÃO EMPREGADA E A CONDIÇÃO DE ARMAZENAMENTO PARA FES-1 E FES-3

Símbolos preenchidos referem-se aos tratamentos da FES-1 e símbolos vazios referem-se aos tratamentos da FES-3. C = substrato colonizado, controle; T = substrato colonizado triturado; M = substrato colonizado triturado e misturado com amido de milho; A = armazenamento em temperatura ambiente e F = armazenamento no frio (4 °C).

Os piores resultados foram obtidos nos tratamentos substrato colonizado triturado (T) para FES-1, e nos tratamentos controle (C) e substrato colonizado triturado (T) para FES-3, armazenados em temperatura ambiente (A). Esses tratamentos apresentaram sinais de contaminação a partir do 90º dia. No armazenamento em temperatura ambiente, somente a formulação substrato triturado misturado com amido de milho (M) para FES-3 apresentou resultado intermediário, com velocidades de perda de viabilidade decrescentes, obtendo 51% de germinação dos esporos após 150 dias.

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que a etapa de secagem é fundamental no desenvolvimento de um produto de biocontrole a partir dos esporos de *C. rosea* sendo que, dentre os processos de secagem utilizados, os melhores resultados foram obtidos na FES-3, onde a secagem é feita durante a fermentação através do uso de papel higiênico para fechar os erlenmeyers. Esse processo traz como vantagens a simplicidade e a economia, por utilizar material simples como papel higiênico, dispensando o uso de uma estufa, e maior rapidez ao processo, por evitar uma etapa de 7 dias de duração.

Além disso, a FES-3 apresentou os melhores processos de formulação: controle (C) e substrato colonizado, triturado e misturado com amido de milho (M), com 90% e 82% de germinação, respectivamente, após 150 dias de armazenamento. Estes dois tratamentos foram armazenados a 4 °C, sendo esta a melhor condição de armazenamento para os esporos de *C. rosea*.

5.1.7 Experimento completo de formulação dos esporos de *Clonostachys rosea* - Avaliação da eficácia dos esporos

A eficácia dos esporos de *C. rosea* na supressão do crescimento de *B. cinerea* foi avaliada através de dois testes:

- teste de eficácia dos esporos por titulação para determinar a menor concentração de esporos de *C. rosea* capaz de reprimir totalmente o crescimento de *B. cinerea* nos quatro pontos de inoculação de uma placa de petri, e

- teste de eficácia dos esporos em maçãs para mimetizar condições do meio ambiente através da avaliação da proteção de frutas em pós-colheita.

Os testes de eficácia foram aplicados para as três fermentações (FES-1, FES-2 e FES-3) nas duas condições de armazenamento (temperatura ambiente (A) e 4 °C (F)) e nos tratamentos: controle (C), substrato colonizado e triturado (T) e substrato colonizado, triturado e misturado com amido de milho (M).

Primeiramente, os testes foram aplicados imediatamente após os processos de formulação e antes e após a etapa de secagem da FES-1, com intuito de avaliar se os procedimentos utilizados afetaram a eficácia inicial dos esporos. No teste de titulação, não foi observado o desenvolvimento do fungo *B. cinerea* em nenhuma das placas. Isso representa um *titer* menor ou igual a 3, isto é, que uma concentração de *C. rosea* menor ou igual a 10^3 esporos/mL foi capaz de suprimir totalmente o desenvolvimento de *B. cinerea* nas condições do teste.

No teste de eficácia em maçãs, feito antes e após a etapa de secagem da FES-1, não foi observado o desenvolvimento de lesões típicas causadas por *B. cinerea*. Da mesma forma, o fungo *B. cinerea* não causou lesões nas maçãs do teste de eficácia feito imediatamente após os processos de formulação nas três fermentações (Tab. 3). Ao contrário, no controle feito com água destilada, o diâmetro médio das lesões nas maçãs foi maior que 3 cm.

TABELA 3 – TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea* EM MAÇÃS APÓS O PROCESSO DE FORMULAÇÃO PARA AS TRÊS FERMENTAÇÕES

	Diâmetro médio das lesões causadas por <i>B. cinerea</i> (cm)			
	C	T	M	Água
FES-1 - Formulação	–	–	–	3,2
FES-2 - Formulação	–	–	–	3,9
FES-3 - Formulação	–	–	–	4,2

– Não foram observadas lesões nas maçãs.

Os resultados obtidos nos dois testes demonstraram que a eficácia dos esporos de *C. rosea* foi elevada em todos os tratamentos. Entretanto, não pode ser feita uma comparação da eficácia entre os tratamentos pois os resultados se

localizaram fora da escala do teste de titulação. Além disso, concluiu-se que a etapa de secagem lenta da FES-1, que não tinha afetado a germinação dos esporos, também não causou danos na sua eficácia.

Na seqüência, os testes de eficácia foram aplicados ao longo do armazenamento das formulações de cada fermentação.

A FES-1 apresentou *titer* menor ou igual a 3 nos tratamentos CF e TF, durante os primeiros 90 dias de armazenamento (Tab 4). Nos três tratamentos armazenados em temperatura ambiente (A) o *titer* aumentou para 5 a partir do 120º dia de armazenamento. Esse resultado concordou com os dados de germinação apresentados na seção anterior, onde a germinação para os tratamentos controle (C), substrato triturado (T) e substrato triturado misturado com amido de milho (M) variou entre 92 e 51% nos primeiros 90 dias e foi inferior a 50% a partir do 120º dia de armazenamento em temperatura ambiente.

TABELA 4 – TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea* POR TITULAÇÃO PARA AS FORMULAÇÕES DA FES-1 DURANTE O ARMAZENAMENTO

Armazenamento	Titulação em cada tratamento					
	CA	CF	TA	TF	MA	MF
15 dias	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3
30 dias	≤ 3	≤ 3	4	≤ 3	4	≤ 3
60 dias	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3	4	≤ 3
90 dias	4	≤ 3	4	≤ 3	4	4
120 dias	5	4	5	4	5	4
150 dias	5	5	6	5	5	5

No teste de eficácia em maçãs para a FES-1 foram constatadas pequenas lesões de *B. cinerea* em diversos tratamentos ao longo do processo de armazenamento (Tab. 5). Essas lesões apresentaram diâmetros médios muito inferiores àqueles obtidos para o controle com água destilada. Os resultados contendo os diâmetros médios \pm erro padrão para cada tratamento, em cada tempo de amostragem determinado (seção 4.3.7.4), são apresentados no APÊNDICE 1.

TABELA 5 – TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea* EM MAÇÃS PARA AS FORMULAÇÕES DA FES-1 DURANTE O ARMAZENAMENTO

Armazenamento	Diâmetro médio das lesões causadas por <i>B. cinerea</i> (cm)						
	CA	CF	TA	TF	MA	MF	Água
15 dias	–	–	–	0,2	0,1	0,6	4,0
30 dias	0,1	–	–	–	–	–	3,4
60 dias	–	–	0,2	–	–	–	2,1
90 dias	0,4	0,3	0,4	–	–	0,3	2,2
120 dias	0,2	0,3	–	0,3	0,2	0,2	2,7
150 dias	0,5	0,9	1,8	1,4	0,6	0,7	4,7

– Não foram observadas lesões nas maçãs.

Ao contrário da FES-1, a FES-2 apresentou valores de *titer* elevados para os tratamentos controle (CA) e substrato triturado (TA), armazenados em temperatura ambiente, desde o início do processo de armazenamento (maiores ou iguais a 6). Isto demonstrou uma diminuição acentuada da eficácia dos esporos nos dois tratamentos visto que mesmo em concentrações elevadas de esporos de *C. rosea* houve desenvolvimento de *B. cinerea* (Tab. 6). Esse resultado foi consistente com as porcentagens de germinação de esporos inferiores a 10% para CA e TA obtidas a partir do 15º dia de armazenamento.

Os tratamentos TF e MA apresentaram comportamentos semelhantes, com *titer* elevado (maior ou igual a 6) principalmente após 90 dias de armazenamento. Os melhores valores de *titer*, mais baixos, foram obtidos para o tratamento substrato triturado misturado com amido de milho (M) armazenado a 4 °C (F), variando, na maioria, entre *titer* 3 e 4 ao longo do armazenamento, comprovando assim os resultados de germinação onde este tratamento também foi o melhor.

TABELA 6 – TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea* POR TITULAÇÃO PARA AS FORMULAÇÕES DA FES-2 DURANTE O ARMAZENAMENTO

Armazenamento	Titulação em cada tratamento					
	CA	CF	TA	TF	MA	MF
15 dias	≥ 8	≤ 3	7	≤ 3	4	≤ 3
30 dias	≥ 8	4	7	4	5	4
60 dias	6	≤ 3	6	4	5	≤ 3
90 dias	7	5	7	6	7	4
120 dias	≥ 8	≤ 3	7	7	7	4
150 dias	≥ 8	6	≥ 8	≥ 8	7	4

Para os tratamentos CA, TA e MA não houve uma boa correlação entre os diâmetros das lesões medidos no teste de eficácia em maçãs e os valores obtidos no teste de titulação (resultados apresentados no APÊNDICE 2). Já o tratamento TF apresentou diâmetros de lesões crescentes ao longo do período de armazenamento, de acordo com os valores de *titer* (Tab. 7). Os resultados contendo os diâmetros médios \pm erro padrão para cada tratamento, em cada tempo de amostragem determinado (seção 4.3.7.4), são apresentados no APÊNDICE 1.

TABELA 7 – TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea* EM MAÇÃS PARA AS FORMULAÇÕES DA FES-2 DURANTE O ARMAZENAMENTO

Armazenamento	Diâmetro médio das lesões causadas por <i>B. cinerea</i> (cm)						
	CA	CF	TA	TF	MA	MF	Água
15 dias	3,1	0,6	–	0,6	0,8	0,8	3,4
30 dias	3,4	–	–	–	–	–	3,3
60 dias	–	–	–	–	–	–	2,4
90 dias	–	0,8	1,3	1,3	1,5	0,6	2,7
120 dias	3,5	0,6	3,2	3,5	2	1,6	3,4
150 dias	3,7	1,7	3,3	3,8	3,7	1,9	4,1

– Não foram observadas lesões nas maçãs.

No tratamento CF, a eficácia elevada dos esporos obtida no teste de titulação até 120 dias de armazenamento foi comprovada pelo teste de maçã, visto que os diâmetros das lesões mantiveram-se baixos para este período. Já no tratamento MF, a eficácia na titulação foi parcialmente comprovada pois os diâmetros médios das lesões no 120º e no 150º dias de armazenamento foram elevados em relação aos valores de *titer* obtidos nestas avaliações (*titer* 4).

Para a FES-3, os valores de *titer* permaneceram baixos (*titer* 4 no máximo) durante os primeiros 60 dias de armazenamento (Tab. 8). Após esse período, apenas os tratamentos CA e TA apresentaram elevação do *titer*, alcançando *titer* maior ou igual a 8 no 120º dia, o que corresponde aos dados de germinação e presença de contaminação obtidos para ambos.

TABELA 8 – TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea* POR TITULAÇÃO PARA AS FORMULAÇÕES DA FES-3 DURANTE O ARMAZENAMENTO

Armazenamento	Titulação em cada tratamento					
	CA	CF	TA	TF	MA	MF
15 dias	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3
30 dias	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3	4	≤ 3
60 dias	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3	≤ 3
90 dias	≥ 8	≤ 3	5	≤ 3	4	≤ 3
120 dias	≥ 8	≤ 3	≥ 8	≤ 3	≤ 3	≤ 3
150 dias	≥ 8	≤ 3	≥ 8	≤ 3	4	4

Para os tratamentos CA e TA o teste de eficácia em maçãs apresentou boa correlação com o teste de titulação, com aumento no diâmetro médio das lesões de *B. cinerea* de acordo com o aumento dos valores de *titer* (Tab. 9) (resultados apresentados no APÊNDICE 2). Nos demais tratamentos ocorreram pequenas lesões ao longo do armazenamento, mas muito menores em comparação com as lesões dos controles. Os resultados contendo os diâmetros médios \pm erro padrão para cada tratamento, em cada tempo de amostragem determinado (seção 4.3.7.4), são apresentados no APÊNDICE 1.

TABELA 9 – TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea* EM MAÇÃS PARA AS FORMULAÇÕES DA FES-3 DURANTE O ARMAZENAMENTO

Armazenamento	Diâmetro médio das lesões causadas por <i>B. cinerea</i> (cm)						Água
	CA	CF	TA	TF	MA	MF	
15 dias	0,9	0,3	0,9	0,3	0,2	–	4,2
30 dias	0,1	–	0,3	–	–	–	3,8
60 dias	0,2	–	–	–	–	–	3,7
90 dias	2,9	–	1,2	–	–	–	3,0
120 dias	2,7	0,1	3,5	0,6	0,2	0,3	3,3
150 dias	3,8	1,4	4,2	0,8	1,8	0,7	4,2

– Não foram observadas lesões nas maçãs.

5.1.8 Avaliação do experimento completo de formulação dos esporos de *Clonostachys rosea*

Embora existam trabalhos na literatura sobre formulação e armazenamento de esporos de *C. rosea*, os dados disponíveis são imprecisos (Tab. 1). Muitas vezes a formulação é relatada como sendo viável por um determinado período em uma determinada condição, entretanto, o valor da viabilidade ou o comportamento dela ao longo do tempo não são apresentados.

O presente trabalho representa o estudo mais completo para o desenvolvimento de um produto de biocontrole com base nos esporos de *C. rosea*, incluindo viabilidade e dois testes de eficácia para os esporos de diferentes formulações, armazenadas em condições distintas.

O teste de eficácia em maçãs complementou o teste por titulação em alguns tratamentos nas três fermentações, onde demonstrou a capacidade dos esporos de *C. rosea*, formulados ou não, de limitar significativamente a expansão das lesões causadas por *B. cinerea*. Entretanto, em várias ocasiões o teste não apresentou boa correlação com o teste de eficácia por titulação e com a viabilidade dos esporos (resultados apresentados no APÊNDICE 2). Estes problemas de reprodutibilidade

podem ter ocorrido devido às variações nos lotes de maçãs utilizados. Assim, o teste de eficácia em maçãs não é recomendado como protocolo confiável.

Ao contrário, os resultados obtidos no teste de eficácia por titulação apresentaram boa correlação com os resultados de germinação de esporos para a maioria dos tratamentos das três fermentações (resultados apresentados no APÊNDICE 2), tornando esse sistema de avaliação um protocolo eficiente que pode ser aplicado no estudo da interação entre outros fungos. Sugere-se que o teste de titulação desenvolvido neste trabalho pode substituir os testes relatados na literatura (PENG e SUTTON, 1991; DALL'ONDER, 1997; SUTTON *et al.*, 2002). Assim, ao invés de utilizar testes com protocolos complexos que utilizam material vegetal e apresentam reprodutibilidade de resultados comprometida, o teste de titulação possibilitará uma avaliação da eficácia dos esporos de *C. rosea* por um protocolo mais simples, de fácil execução e com resultados reprodutíveis. Entretanto, antes disso será necessário avaliar a correlação entre o resultado do teste de titulação e a eficácia dos esporos de *C. rosea* à campo. Somente depois de comprovar esta correlação será possível recomendar o teste de titulação como um teste totalmente confiável e rotineiro para laboratório.

De acordo com os dados obtidos e as considerações anteriores, conclui-se que a FES-3 é uma alternativa factível e “escalonável” para ser adotada na produção de um biopesticida a partir dos esporos de *C. rosea*. Essa FES é um processo economicamente viável pois utiliza um processo de secagem simples e rápido, através do fechamento dos erlenmeyers com pedaços de papel higiênico durante a fermentação.

Com relação à formulação, os melhores resultados foram obtidos na FES-3 para os tratamentos controle (C) e substrato colonizado, triturado e misturado com amido de milho (M). Ambos foram armazenados por 150 dias a 4 °C, sendo esta considerada a melhor condição para o armazenamento dos esporos de *C. rosea*.

Além disso, os valores de *titer* para FES-3 permaneceram baixos ($titer \leq 4$) durante os 150 dias de armazenamento para os tratamentos CF, TF, MA e MF. Esses valores apresentaram boa correlação com os resultados de germinação e com a maioria dos resultados do teste de eficácia em maçãs (resultados apresentados no APÊNDICE 2).

5.2. EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS DO MICÉLIO E EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Clonostachys rosea*

Nesta seção são apresentados os resultados referentes aos estudos realizados para caracterizar as estruturas de um polissacarídeo presente no micélio de *C. rosea* e do polissacarídeo liberado no meio de cultivo (exopolissacarídeo).

5.2.1 Fermentação líquida de superfície de *Clonostachys rosea* e caracterização inicial dos polissacarídeos

Inicialmente *C. rosea* foi cultivado em uma fermentação líquida de superfície (FLS), utilizando meio mínimo (10 g L^{-1} glucose inicial), com intuito de avaliar a produção de biomassa e de EPS, assim como o consumo de glucose. Como pode ser observado na Figura 21, a produção de biomassa apresentou um crescimento inicial proeminente, alcançando uma concentração máxima de $3,4 \text{ g L}^{-1}$ no 9º dia. Durante este período o teor de glucose decaiu de sua concentração original de $10,2 \text{ g L}^{-1}$ para $0,4 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que a concentração de EPS aumentou para $0,1 \text{ g L}^{-1}$. No 9º dia, o coeficiente de rendimento de biomassa a partir da glucose ($Y_{x/s}$) foi de $0,35 \text{ g g}^{-1}$. Após o 9º dia a concentração de biomassa decaiu, atingindo um platô de aproximadamente 2 g L^{-1} a partir do 21º dia. Inversamente, durante o período do dia 9 ao dia 24, a concentração de EPS aumentou significativamente, alcançando um máximo de $0,6 \text{ g L}^{-1}$ no 24º dia. Após atingir a produção máxima, o nível de EPS decaiu, atingindo um platô de aproximadamente $0,4 \text{ g L}^{-1}$ a partir do 40º dia.

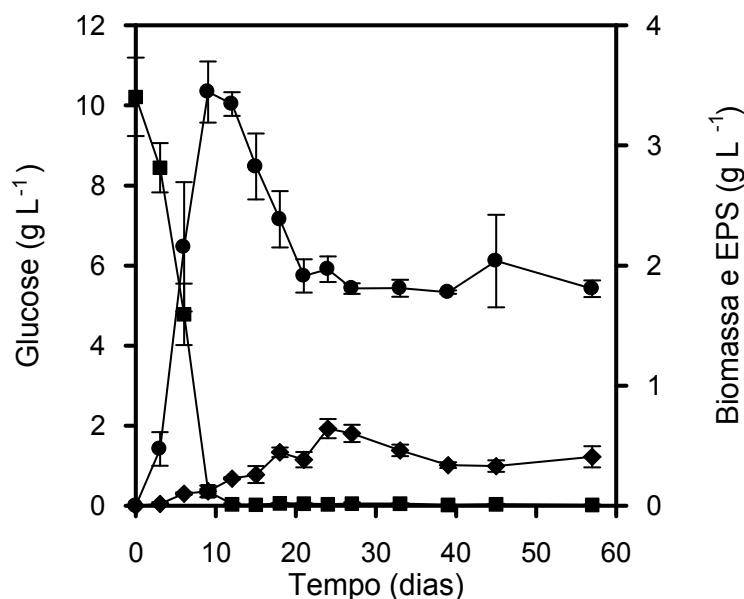


FIGURA 21 – PERFIS DE (●) BIOMASSA TOTAL, (◆) EPS E (■) CONSUMO DE GLUCOSE DE *Clonostachys rosea* DURANTE FLS COM 10 g L⁻¹ DE GLUCOSE INICIAL

Uma FLS em escala maior (em erlenmeyers de 2000 mL) foi feita para produzir quantidade de biomassa e meio de cultivo suficientes para uma caracterização preliminar dos polissacarídeos. Após 21 dias de FLS, a biomassa foi separada do meio de cultivo por filtração a vácuo. A seguir a biomassa filtrada foi deslipidificada e despigmentada. O material residual foi extraído com água (100 °C), dando origem ao extrato aquoso. Após remoção da biomassa por filtração, o EPS no meio de cultura filtrado foi precipitado com etanol gelado.

A Tabela 10 apresenta as composições monossacarídicas para o extrato aquoso da biomassa e para o EPS em todos os estágios do processo de purificação (Fig. 11). Nota-se que ambas contêm quantidades significativas de manose, galactose e glucose (daqui por diante, para simplificar, o polissacarídeo do extrato aquoso da biomassa será denominado de “polissacarídeo da biomassa”). Nota-se ainda que as composições do polissacarídeo da biomassa e do EPS são muito similares e que elas não apresentam grandes variações nas diferentes frações obtidas ao longo dos estágios do processo de purificação para cada um deles.

TABELA 10 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, EM VÁRIOS ESTÁGIOS DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO, DO POLISSACARÍDEO DA BIOMASSA E DO EPS OBTIDOS APÓS 21 DIAS DE CULTIVO EM FLS DE *Clonostachys rosea*

Frações	Polissacarídeo da biomassa		Exopolissacarídeo	
	Sigla	Man:Gal:Glc (%) ^a	Sigla	Man:Gal:Glc (%) ^a
Precipitado por etanol	PB	32:40:28	PE	36:37:27
Sobrenadante de congelamento-degelo	S-PB	31:43:26	S-EPS	35:41:24
Precipitado de congelamento-degelo	P-PB	33:29:38	P-EPS	43:22:35
Eluído com membrana de 50 kDa	50E-PB	37:37:26	50E-EPS	57:24:19
Retido com membrana de 50 kDa	50R-PB	29:45:26	50R-EPS	32:45:23
Eluído com membrana de 100 kDa	100E-PB	37:37:26	100E-EPS	56:28:16
Retido com membrana de 100 kDa	100R-PB	25:38:37	100R-EPS	29:47:24
Eluído com membrana de 250 kDa	Não feito	Não feito	250E-EPS	54:31:15
Retido com membrana de 250 kDa	Não feito	Não feito	250R-EPS	32:45:23
Eluído com membrana de 500 kDa	500E-PB	26:43:31	500E-EPS	47:34:19
Retido com membrana de 500 kDa	500R-PB	23:45:32	500R-EPS	29:48:23
Eluído com membrana de 1000 kDa	1000E-PB	25:47:28	1000E-EPS	23:48:29
Retido com membrana de 1000 kDa	1000R-PB	21:43:36	1000R-EPS	30:46:24

^a Analisado em CG-EM após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

O processo de purificação do polissacarídeo da biomassa e do EPS (Fig. 11) foi acompanhado por análise de HPSEC, com a finalidade de observar se o procedimento empregado estava sendo eficaz (Figs. 22 e 23). Nota-se que as frações eluídas através da membrana de 1000 kDa *cut-off* apresentaram-se homogêneas para o polissacarídeo da biomassa (1000E-PB) e para o EPS (1000E-EPS), sendo consideradas purificadas. Além disso, as proporções molares de Man, Gal e Glc, destas duas frações, foram praticamente idênticas, sendo 25:47:28 para o polissacarídeo da biomassa e 23:48:29 para o EPS (Tab. 10).

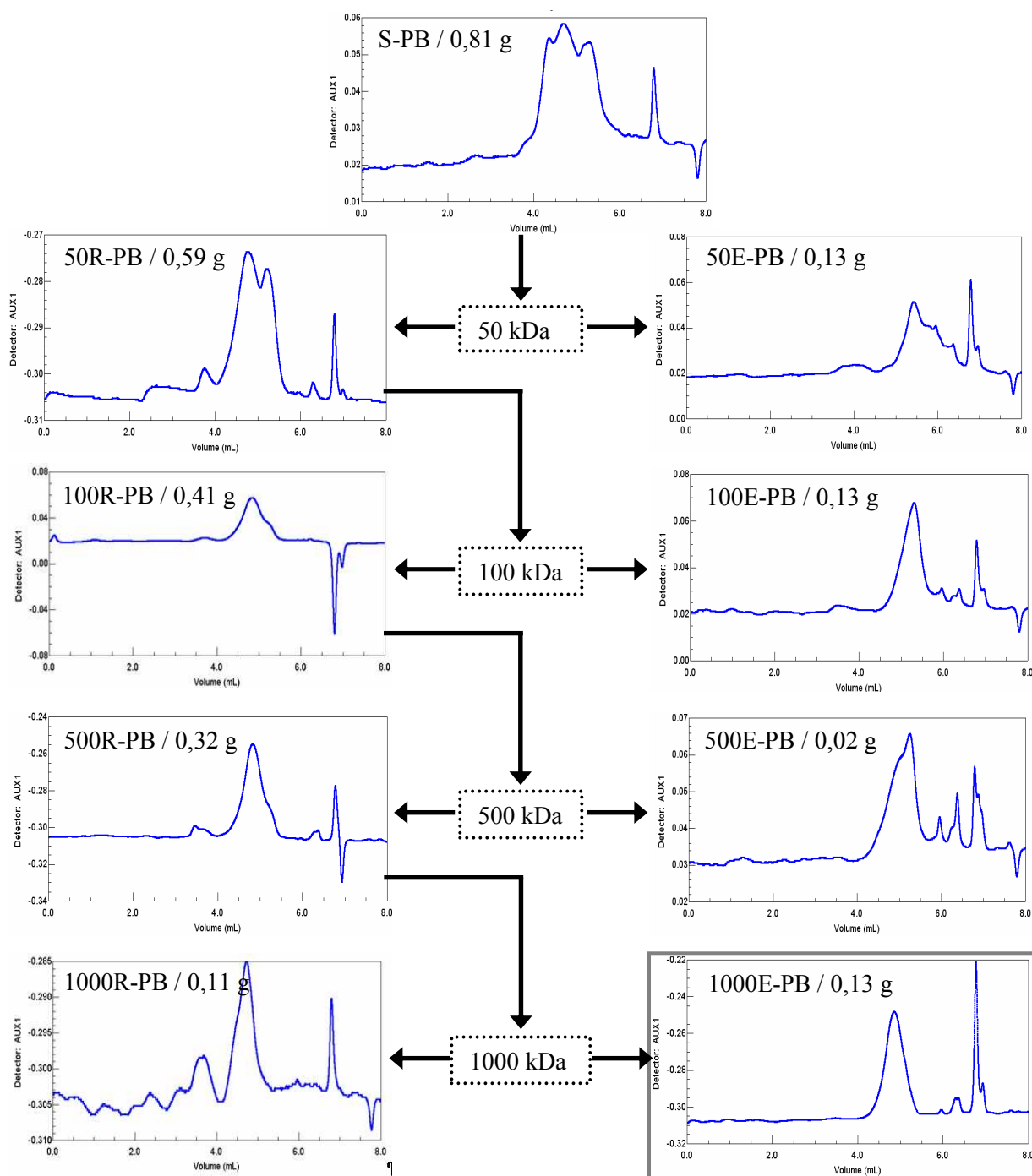


FIGURA 22 – ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DA BIOMASSA DE *Clonostachys rosea* POR HPSEC

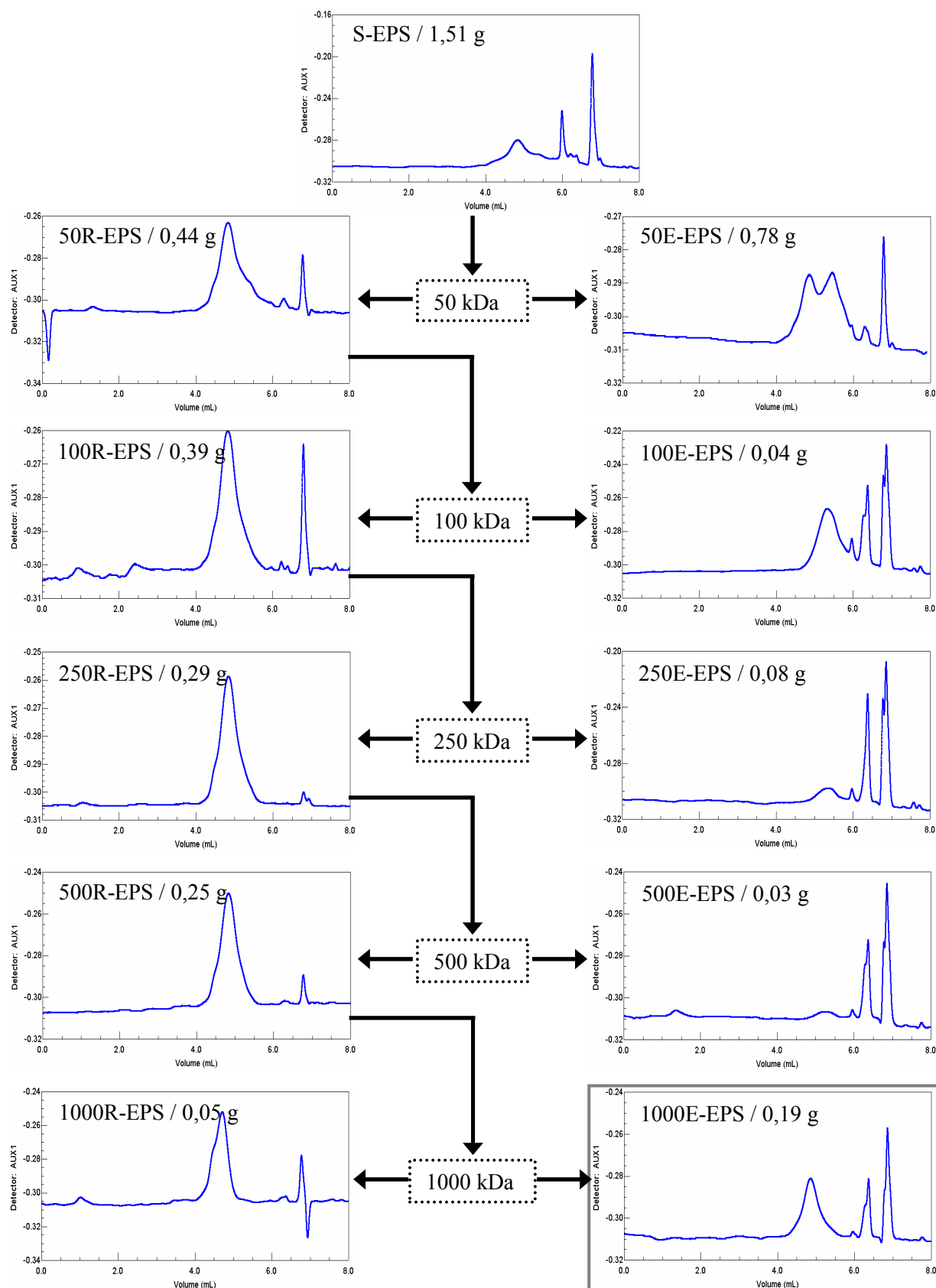


FIGURA 23 – ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DO EPS DE *Clonostachys rosea* POR HPSEC

A similaridade dos polissacarídeos também foi confirmada através de espectros de RMN- ^{13}C (Fig. 24). Em cada caso, o espectro do polissacarídeo purificado foi essencialmente idêntico àquele de uma fração removida em uma etapa inicial do processo de purificação (para o polissacarídeo da biomassa compare Fig. 24a com Fig. 24b; para o EPS, compare Fig. 24c com Fig. 24d). Além disso, o espectro da fração purificada do polissacarídeo da biomassa (Fig. 24b) e da fração purificada do EPS (Fig. 24d) foram muito similares.

5.2.2 Fermentação líquida de superfície de *C. rosea* em uma concentração inicial de glucose mais elevada

Com base nos resultados obtidos na FLS original, surgiu a hipótese que o EPS poderia ser um polissacarídeo que formava originalmente uma parte da biomassa, mas que foi liberado através da autólise da biomassa, a qual ocorreu lentamente na presença de glucose mas acelerou após sua depleção.

Se a hipótese fosse correta, ela teria duas consequências que poderiam ser testadas. Primeiro, ao adicionar uma concentração de glucose inicial mais elevada, seria esperado que o tempo para a completa depleção de glucose fosse maior, o que causaria um atraso na aceleração da produção de EPS em relação à FLS original. Segundo, ao analisar algumas amostras ao longo do processo fermentativo, seria esperado que a composição monossacarídica do EPS permanecesse similar à do polissacarídeo da biomassa.

Para verificar a primeira predição, uma nova FLS de *C. rosea* foi feita com uma concentração inicial de glucose de $26,6 \text{ g L}^{-1}$ (2,6 vezes maior do que a FLS original). A glucose decaiu para $0,02 \text{ g L}^{-1}$ em 18 dias, período no qual a biomassa atingiu seu máximo de produção de $9,4 \text{ g L}^{-1}$, que foi aproximadamente 3 vezes superior a FLS original (Fig. 25). Notou-se ainda, que o coeficiente de rendimento de biomassa a partir da glucose ($Y_{x/s}$) no 18º dia foi de $0,36 \text{ g g}^{-1}$, muito similar ao coeficiente obtido na FLS original.

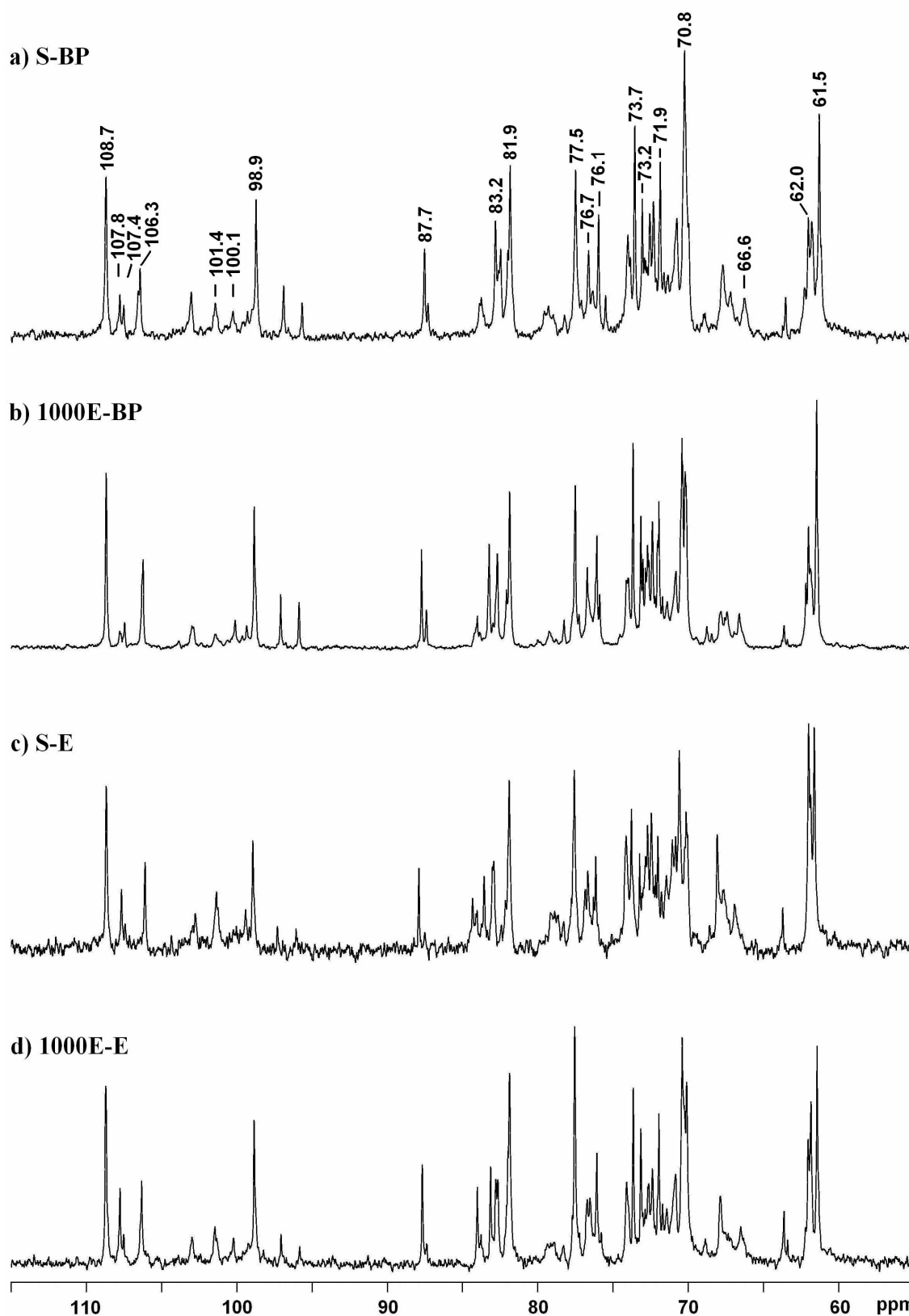


FIGURA 24 – ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES DO POLISSACARÍDEO DA BIOMASSA E DO EPS, OBTIDAS EM ETAPAS INICIAIS E NO FINAL DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO

(a) Fração S-PB; (b) Fração 1000E-PB (fração final homogênea); (c) Fração S-EPS e (d) Fração 1000E-EPS (fração final homogênea). Análise realizada em D_2O , a 70°C .

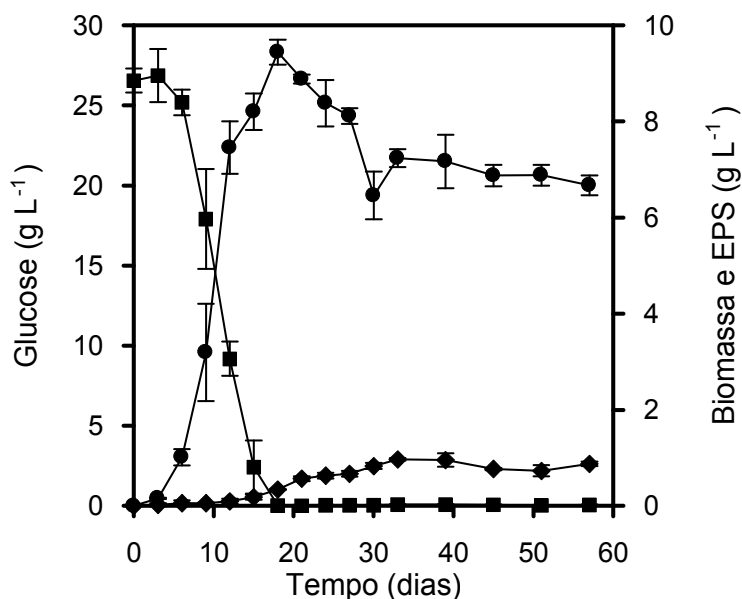


FIGURA 25 – PERFIS DE (●) BIOMASSA TOTAL, (◆) EPS E (■) CONSUMO DE GLUCOSE DE *Clonostachys rosea* DURANTE FLS COM 30 g L⁻¹ DE GLUCOSE INICIAL

Após o 18º dia, o nível de biomassa decaiu, atingindo um platô de aproximadamente 7 g L⁻¹ a partir do 30º dia. Como predito pela hipótese, ocorreu um atraso na produção de EPS e o aumento na produção ocorreu somente após o 15º dia, quando os níveis de glucose estavam muito baixos e a velocidade de produção de biomassa já havia diminuído significativamente. O nível de EPS alcançou um máximo de 1,0 g L⁻¹ no 33º dia e depois decaiu, atingindo um platô de aproximadamente 0,8 g L⁻¹ a partir do 45º dia.

Notou-se o aparecimento de EPS antes da total depleção da glucose, em baixas concentrações, nos perfis de EPS da FLS original e da segunda FLS (Figs. 21 e 25). Esse EPS pode ter se originado em um processo de autólise da biomassa. Esse processo ocorre, mesmo em presença de glucose, porque o crescimento do fungo em forma de camada espessa na superfície pode causar depleção nos níveis de O₂ e de glucose no interior da camada, o que induz a autólise da biomassa interna e, consequentemente, a liberação de EPS para o meio de cultivo.

A segunda predição foi verificada através da determinação das composições monossacarídicas de amostras de EPS coletadas em diferentes tempos durante a FLS original (10 g L⁻¹) e a segunda FLS (30 g L⁻¹). Em ambos os casos, as composições permaneceram razoavelmente constantes ao longo do tempo, embora

o teor de glucose tenha apresentado uma tendência à diminuição (Fig. 26). Os perfis das duas culturas foram muito similares e as proporções foram razoavelmente próximas à proporção encontrada na fração PB do polissacarídeo da biomassa (32 Man : 40 Gal : 28 Glc).

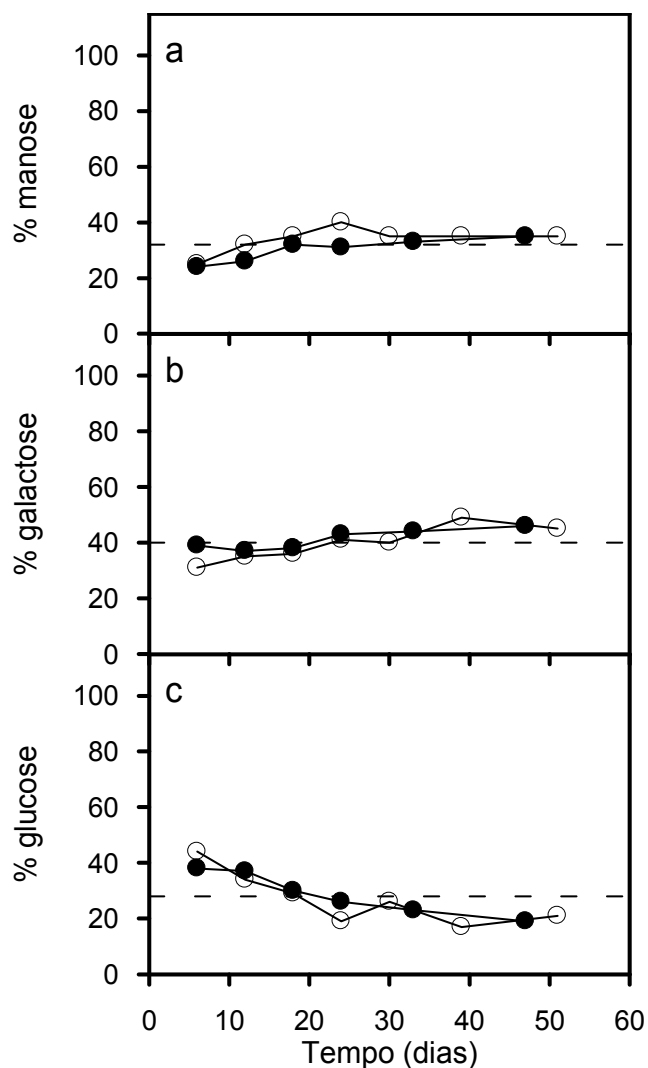


FIGURA 26 – PERFIS DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EPS: (A) MAN (B) GAL E (C) GLC; PARA A (●) FLS ORIGINAL (10 g L^{-1}) E PARA A (○) SEGUNDA FLS (30 g L^{-1}), EM COMPARAÇÃO COM A COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PB (---)

5.2.3 Estudos estruturais do polissacarídeo da biomassa e do EPS de *Clonostachys rosea*

Como mostrado pelas Figuras 24b e 24d, os espectros de RMN- ^{13}C das frações purificadas do polissacarídeo da biomassa (1000E-PB) e do EPS (1000E-EPS) foram muito semelhantes. A similaridade destes polissacarídeos foi também confirmada por experimentos de RMN- ^1H (Fig. 27), cujos espectros apresentaram similaridade nas posições dos picos e, para muitos destes picos, as intensidades relativas também foram comparáveis. Os dois polissacarídeos parecem ter uma estrutura química muito complexa, visto que as regiões anoméricas apresentaram 10 sinais nos espectros de RMN- ^{13}C e pelo menos 8 sinais nos espectros de RMN- ^1H .

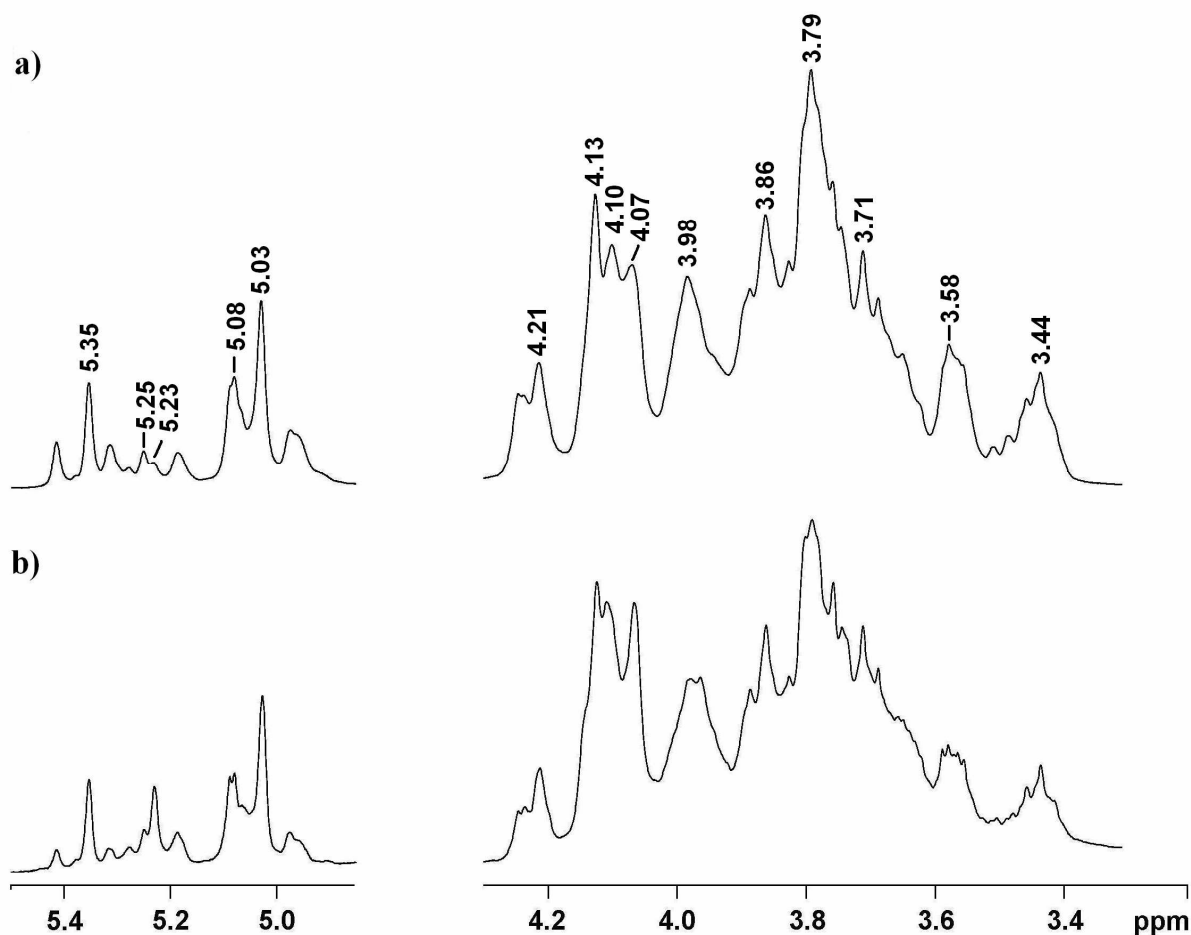


FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN- ^1H DE (A) FRAÇÃO PURIFICADA DO POLISSACARÍDEO DA BIOMASSA 1000E-PB E (B) FRAÇÃO PURIFICADA DO EPS 1000E-EPS

O procedimento de metilação também confirmou a similaridade das frações 1000E-PB e 1000E-EPS (Tab. 11). Ambas apresentaram unidades de glucopiranosose 2-O-substituídas (“→2)-Glc p -(1→”) e terminais não redutores de glucopiranosose (Glc p -(1→”). Apresentaram também resíduos de galactose na forma furanosídica substituídos de quatro maneiras diferentes: (i) 5-O-substituído (“→5)-Gal f -(1→”); (ii) 6-O-substituído (“→6)-Gal f -(1→”); (iii) 5,6-di-O-substituído (“→5,6)-Gal f -(1→”); e (iv) 2,6-di-O-substituído (“→2,6)-Gal f -(1→”). Além destes resíduos, estas frações apresentaram resíduos de manopiranosose substituídos de três maneiras diferentes: (i) 2-O-substituído (“→2)-Man p -(1→”); (ii) 6-O-substituído (“→6)-Man p -(1→”); e (iii) 2,6-di-O-substituído (“→2,6)-Man p -(1→”).

TABELA 11 – ANÁLISE DE METILAÇÃO COMPARATIVA DAS FRAÇÕES HOMOGÊNEAS 1000E-PB E 1000E-EPS

Alditóis acetatos parcialmente O-metilados ^a	Ligações correspondentes	Frações polissacarídicas (%) ^b	
		1000E-PB	1000E-EPS
2,3,4,6-Me ₄ -Man	Man p -(1→	2	2
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	Glc p -(1→	20	17
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	Gal f -(1→	2	4
3,4,6-Me ₃ -Man	→2)-Man p -(1→	7	11
3,4,6-Me ₃ -Glc	→2)-Glc p -(1→	6	5
2,3,6-Me ₃ -Gal	→5)-Gal f -(1→	19	21
2,3,4-Me ₃ -Man	→6)-Man p -(1→	10	8
2,3,5-Me ₃ -Gal	→6)-Gal f -(1→	4	8
3,4-Me ₂ -Man	→2,6)-Man p -(1→	10	7
2,3-Me ₂ -Gal	→5,6)-Gal f -(1→	9	6
3,5-Me ₂ -Gal	→2,6)-Gal f -(1→	11	11

^a Metilação realizada segundo Ciucanu e Kerek (1984). Após metilação, os derivados foram hidrolisados pelo método descrito por Saeman *et al.* (1954). ^b Percentual relativo dos derivados metilados nas frações polissacarídicas.

Através de comparações entre valores de deslocamentos químicos descritos na literatura com aqueles obtidos nos experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HMQC (resultados apresentados no APÊNDICE 3) e COSY, foi possível confirmar a presença da maioria dos resíduos indicados pela análise da metilação (Tab. 12). A presença de quatro unidades diferentes de Gal β foi confirmada através dos espectros de HMQC para as duas frações purificadas, sendo que a fração 1000E-PB apresentou quatro sinais C-1/H-1 em δ 108,7/5,03, 107,8/5,25, 107,4/5,25 e 106,3/5,35, e a fração 1000E-EPS apresentou sinais em δ 108,7/5,03, 107,8/5,23, 107,5/5,23 e 106,3/5,36 (LEAL *et al.*, 1997; PRIETO *et al.*, 1997; AHRAZEM *et al.*, 2001b). A presença dos sinais de C-1 em campo baixo indicou que os carbonos anoméricos das unidades de Gal β possuem configuração β (PERLIN; CASU, 1969; GORIN; MAZUREK, 1975; SASSAKI *et al.*, 2005b) (Tab. 12).

No caso dos resíduos de manopiranose, os sinais detectados nos espectros de RMN de ^1H e de HMQC apresentaram menor intensidade para ambas as frações 1000E-PB e 1000E-EPS. Com isso, foi impossível identificar os deslocamentos químicos de todos os carbonos e prótons, mas sinais de C-1/H-1 característicos (ou pelo menos C-1) puderam ser atribuídos para resíduos α -manopiranose 2-O-, 6-O- e 2,6-di-O-substituídos em δ 101,4/5,23, 100,1 e 99,3 para 1000E-PB e 101,4/5,23, 100,2 e 99,2 para 1000E-EPS (GORIN; IACOMINI, 1985; LEAL *et al.*, 1996; GÓMEZ-MIRANDA *et al.*, 2004; PRIETO *et al.*, 2008). Concluiu-se que estas unidades de manose fazem parte de um núcleo de manana, como já relatado para outros polissacarídeos fúngicos (PRIETO *et al.*, 1997; AHRAZEM *et al.*, 1999, 2001a).

Por fim, a configuração α dos terminais não redutores de Glcp foi deduzida a partir de sinais C-1/H-1 em δ 98,9/5,08 para 1000E-PB e em 98,8/5,08 para 1000E-EPS (AHRAZEM *et al.*, 1997, 2006) (Tab. 12).

TABELA 12 – SINAIS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C (δ) PARA AS FRAÇÕES HOMOGÊNEAS 1000E-PB E 1000E-EPS

Unidades		Próton ou carbono para 1000E-PB								Próton ou carbono para 1000E-EPS						
		1	2	3	4	5	6a	6b		1	2	3	4	5	6a	6b
$\rightarrow 5$)- β -Galf-(1 \rightarrow ^a	H	5,03	4,13	4,10	4,10	3,98	3,79	3,79	H	5,03	4,13	4,11	4,11	3,97	3,79	3,79
	C	108,7	81,9	77,5	82,7	76,7	62,0		C	108,7	81,9	77,6	82,7	76,5	61,9	
$\rightarrow 6$)- β -Galf-(1 \rightarrow ^a	H	5,25	4,13	4,10	4,07	3,98	3,62	3,88	H	5,23	4,13	4,07	4,07	3,98	3,64	3,89
	C	107,8	82,1	77,5	84,0	70,4	70,2		C	107,8	81,9	77,6	84,0	70,4	70,1	
$\rightarrow 5,6$)- β -Galf-(1 \rightarrow ^b	H	5,25	–	–	–	–	–	–	H	5,23	–	–	–	–	–	–
	C	107,4	–	–	–	–	–		C	107,5	–	–	–	–	–	
$\rightarrow 2,6$)- β -Galf-(1 \rightarrow ^c	H	5,35	4,21	4,21	4,07	3,98	3,89	3,63	H	5,36	4,22	4,22	4,07	3,98	3,89	3,64
	C	106,3	87,7	76,1	83,2	70,4	70,2		C	106,3	87,7	76,1	83,1	70,4	70,1	
$\rightarrow 2$)- α -Manp-(1 \rightarrow ^d	H	5,23	–	–	–	–	3,86	3,76	H	5,23	–	–	–	–	3,89	3,76
	C	101,4	79,2	–	–	–	61,9		C	101,4	78,9	–	–	–	61,9	
$\rightarrow 6$)- α -Manp-(1 \rightarrow ^d	H	–	–	3,83	–	–	3,99	3,76	H	–	–	–	–	–	–	–
	C	100,1	70,8	71,4	67,4	–	66,6		C	100,2	70,9	–	–	–	66,5	
$\rightarrow 2,6$)- α -Manp-(1 \rightarrow ^d	H	–	4,07	–	–	–	3,98	3,76	H	–	4,07	–	–	–	3,98	3,76
	C	99,3	79,2	–	–	–	66,6		C	99,2	79,4	–	–	–	66,5	
α -Glc p-(1 \rightarrow ^e	H	5,08	3,58	3,71	3,44	3,76	3,86	3,76	H	5,08	3,58	3,71	3,44	3,76	3,86	3,76
	C	98,9	71,9	73,7	70,4	73,2	61,5		C	98,8	72,0	73,7	70,4	73,2	61,4	

De acordo com as referências: ^a Prieto *et al.* (1997); ^b Leal *et al.* (1997); ^c Ahrazem *et al.* (2001b); ^d Gómez-Miranda *et al.* (2004); Gorin e Iacomini (1985); Leal *et al.* (1996); Prieto *et al.* (2008) e ^e Ahrazem *et al.* (1997, 2006).

– Não determinado

A presença da maioria dos resíduos indicados pela análise da metilação (Tab. 12) também foi confirmada através de análises de espectros de RMN- ^{13}C -DEPT (Fig. 28).

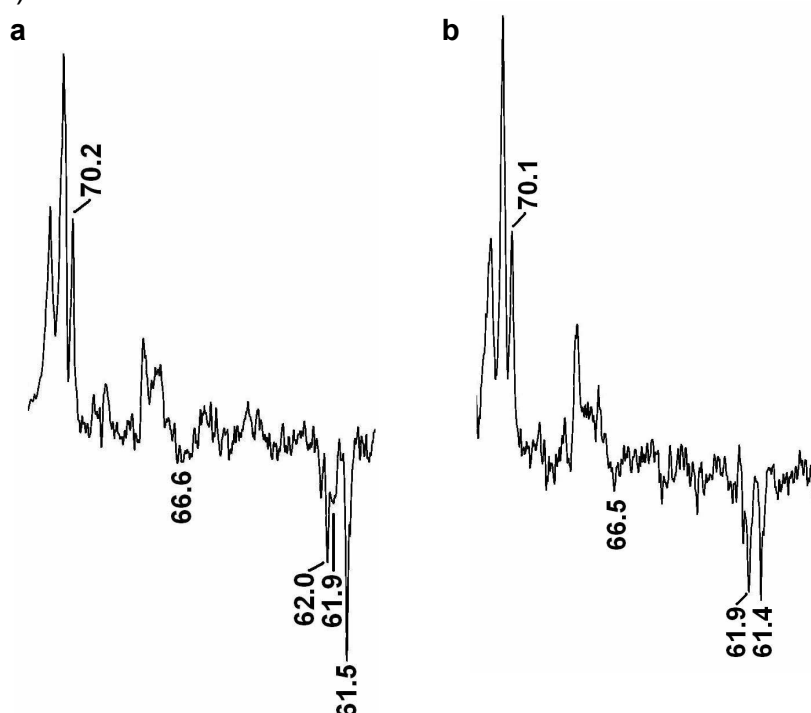


FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN- ^{13}C -DEPT DE (A) FRAÇÃO PURIFICADA DO POLISSACARÍDEO DA BIOMASSA 1000E-PB E (B) FRAÇÃO PURIFICADA DO EPS 1000E-EPS

No espectro de RMN- ^{13}C -DEPT da fração 1000E-PB, o sinal de C-6 em 70,2 ppm indicou a presença de unidades de *Gal*f 6-O-substituídas e 2,6-di-O-substituídas, confirmadas por uma diminuição da intensidade do correspondente sinal de $-\text{CH}_2$ em comparação ao sinal original do espectro de RMN- ^{13}C (Fig. 24b). Da mesma forma, o sinal em 66,6 ppm indicou a presença de unidades de *Man*p 6-O-substituídas e 2,6-di-O-substituídas, confirmadas por uma inversão do correspondente sinal de $-\text{CH}_2$ na análise RMN- ^{13}C -DEPT. Neste espectro também foi possível observar sinais invertidos para C-6 não substituído de unidades de *Gal*f 5-O-substituídas, *Man*p 2-O-substituídas e terminais não redutores de *Glc*p, em 62,0; 61,9 e 61,5 ppm, respectivamente.

A análise do espectro de RMN- ^{13}C -DEPT da fração 1000E-EPS foi muito semelhante a anterior. O sinal de C-6 em 70,1 ppm apresentou diminuição da intensidade do correspondente sinal de $-\text{CH}_2$ em comparação ao sinal original do espectro de RMN- ^{13}C (Fig. 24d), o que indicou a presença de unidades de *Gal*f 6-O-substituídas e 2,6-di-O-substituídas. Da mesma forma, o sinal invertido de $-\text{CH}_2$ em

66,5 ppm confirmou a presença de unidades de Manp 6-O-substituídas e 2,6-di-O-substituídas. Por fim, um sinal invertido para C-6 não substituído foi observado em 61,9 ppm, confirmando a presença de unidades de Galf 5-O-substituídas e Manp 2-O-substituídas, e um sinal invertido em 61,4 ppm confirmou a presença de terminais não redutores de Glcp.

Com base nestes resultados, concluiu-se que as frações 1000E-PB e 1000E-EPS são galactomananas com estruturas muito semelhantes.

5.2.4 Análise dos resultados obtidos para os polissacarídeos de *Clonostachys rosea*

Nesta parte da tese foi apresentada a purificação e a caracterização química de uma galactomanana que aparece tanto na parede celular quanto no caldo de cultivo durante FLS de *C. rosea*. Este trabalho representa a primeira caracterização de polissacarídeos do fungo *C. rosea*.

5.2.4.1 Origem do EPS de *Clonostachys rosea*

De acordo com os resultados obtidos, o polímero rico em galactofuranose precipitado a partir do caldo do cultivo (EPS) é muito similar ao polissacarídeo da biomassa de *C. rosea* obtido por extração aquosa. Este fenômeno foi relatado previamente para outros fungos. Por exemplo, uma galactomanana da parede celular de *Aspergillus fumigatus* foi encontrada também no filtrado da cultura (STYNEN *et al.*, 1992) enquanto as paredes celulares de diversas espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* (PARRA *et al.*, 1994; LEAL *et al.*, 1997) contêm um polissacarídeo com estrutura muito similar ao exopolissacarídeo varianose que é produzido pelo fungo *Penicillium varians* (JANSSON; LINDBERG, 1980). Além disso, uma β -(1 \rightarrow 5)-galactofuranana isolada do peptidofosfopolissacarídeo extracelular de *Penicillium charlesii* (GANDER *et al.*, 1974) ocorre também como componente da parede celular desta espécie (GANDER; FANG, 1976) e de diversos outros fungos do gênero *Penicillium* (LEAL *et al.*, 1997).

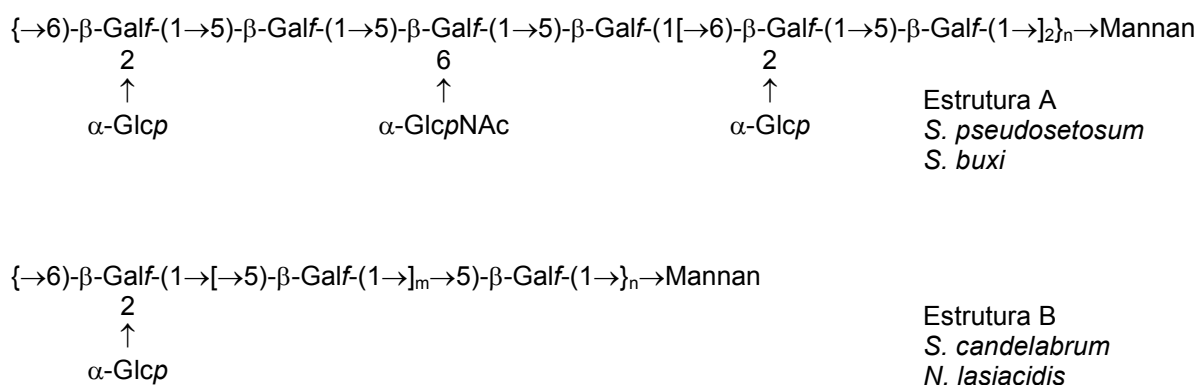
Notou-se que os níveis de EPS estiveram relativamente baixos até que a glucose do meio de cultivo fosse praticamente exaurida e que o maior aumento nos níveis de EPS correspondeu à fase em que os níveis de biomassa estavam decaindo (Figs. 21 e 25). Ahrazem *et al.* (2001a) notaram um fenômeno semelhante e sugeriu que, neste caso, o EPS correspondia provavelmente a um componente da parede celular que foi liberado durante o processo de autólise do micélio. Se esta hipótese estiver correta, o presente trabalho sugere que somente os polissacarídeos mais facilmente extraídos da parede celular são liberados durante o processo de autólise.

Esta conclusão baseia-se no fato de que, neste trabalho, a galactomanana caracterizada na biomassa (e que foi liberada no meio de cultivo pela autólise) foi extraída da biomassa utilizando condições menos agressivas de extração (água fervendo). Um tratamento mais drástico (2% de KOH, água fervente) extraiu polissacarídeos da biomassa compostos predominantemente por glucose (resultados apresentados no APÊNDICE 4), mas não há nenhuma evidência da presença destes polímeros ricos em glucose no polissacarídeo precipitado a partir do caldo de cultivo.

Isto é consistente com a estrutura proposta para a parede celular fúngica, onde as β -glucanas estão ligadas a uma bainha interna de quitina através de ligações relativamente resistentes, enquanto que as galactomananas são encontradas em uma camada mais externa e expostas na superfície da parede celular (SMITS *et al.*, 2001; KLIS *et al.*, 2002; ODDS *et al.*, 2003). Assim, durante a autólise esta camada exterior seria liberada no caldo de cultivo fermentado. Visto que os polímeros ricos em glucose e em glucosamina não são encontrados no EPS, é mais provável que a quitina e as β -glucanas permanecem unidas ao restante da biomassa como bainhas vazias.

5.2.4.2 Natureza do polissacarídeo da parede celular de *Clonostachys rosea*

Os resultados apresentados neste trabalho sobre a galactomanana isolada da biomassa do fungo *C. rosea* são consistentes com as estruturas apresentadas por Ahrazem *et al.*, (2001b) para quatro fungos que pertencem à mesma família do fungo *C. rosea*, ou seja, a Família Bionectriaceae: *Sesquicillium pseudosetosum*, *Sesquicillium buxi*, *Sesquicillium candelabrum* e *Nectria lasiacidis*. Estes pesquisadores propuseram as seguintes estruturas para os polissacarídeos da fração F1SS:



Embora o método de extração usado no presente trabalho seja diferente (água fervente), os dados são consistentes com estas estruturas. As diferentes unidades de manose que foram encontradas seriam partes do núcleo enquanto que “ $\rightarrow 5$)- β -Gal f -(1 \rightarrow ” e “ $\rightarrow 6$)- β -Gal f -(1 \rightarrow ”, unidades identificadas na análise de metilação, seriam consistentes com as cadeias de galactofuranose destas estruturas. Unidades de glucose terminais também foram detectadas.

Uma característica interessante dos resultados obtidos é a presença de unidades “ $\rightarrow 2$)-Glc p -(1 \rightarrow ” que não aparecem nas estruturas mostradas acima. Embora este tipo de unidade não seja particularmente comum em galactomananas fúngicas, já foi relatado como componente traço para a fração F1SS de outro ascomiceto, *Acrospermum compressum* (PRIETO *et al.* 2007).

A galactomanana de *C. rosea* merece atenção adicional, visto que as moléculas da superfície da parede celular dos fungos desempenham uma função importante nas interações fungo-hospedeiro (ROSADO *et al.*, 2007). De fato,

resíduos de galactofuranose, que fazem parte tanto do polissacarídeo da biomassa quanto do EPS, têm sido citados por alguns autores como resíduos envolvidos diretamente nos mecanismos de reconhecimento (SUZUKI *et al.*, 1997; LEVERY *et al.*, 1998; CORDEIRO *et al.*, 2005).

Estudos futuros podem seguir as estratégias que Schmalhorst *et al.* (2008) aplicou em pesquisas com *Aspergillus fumigatus*. Eles deletaram o gene *glfA* que codifica para a enzima UDP-galactopiranosose mutase, uma enzima chave no metabolismo da galactofuranose, gerando um mutante sem galactofuranose. A aplicação de uma estratégia semelhante em *C. rosea* permitiria a realização de estudos para compreender a importância dos resíduos de galactofuranose da parede celular no mecanismo de ação por micoparasitismo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese fez contribuições em duas áreas relacionadas à ação de biocontrole do fungo *C. rosea*, nomeadamente, no estudo de formulações para seus esporos visando o desenvolvimento de um produto de biocontrole e no estudo de seus polissacarídeos.

6.1 ESTUDOS DE FORMULAÇÃO DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea*

Estudos anteriores de formulação desenvolvidos para os esporos de *C. rosea* destinavam-se ao tratamento de sementes. Poucos estudos focavam a aplicação direta do produto formulado em plantas. Além disso, as avaliações das formulações muitas vezes foram feitas de forma incompleta, apresentando somente testes de germinação ou somente ensaios biológicos.

Assim, uma das contribuições deste trabalho foi a elaboração de um estudo completo para o desenvolvimento de um produto de biocontrole com base nos esporos de *C. rosea*. As principais conclusões obtidas foram:

- a viabilidade dos esporos diminuiu em todos os tratamentos durante o período de armazenamento avaliado, entretanto, a velocidade de perda de viabilidade variou muito com as condições de formulação e armazenamento, sendo menor para os tratamentos armazenados a 4 °C;
- a alta umidade de uma formulação é prejudicial, porque facilita o desenvolvimento de contaminantes durante o armazenamento;
- a secagem lenta durante ou após a fermentação é benéfica, visto que proporciona a manutenção da viabilidade e da eficácia dos esporos elevada e impede o desenvolvimento de microrganismos contaminantes.

Com base nos resultados desta tese, é recomendável fazer uma secagem lenta durante o processo de fermentação para produção de esporos de *C. rosea*, através do uso de um tampão de papel higiênico. A seguir, o substrato colonizado pode ser triturado e misturado com amido de milho ou pode ser diretamente

armazenado. Este armazenamento deve ser feito em uma geladeira, a 4 °C, por até 150 dias.

Os conhecimentos produzidos a partir deste trabalho representam o ponto de partida para o desenvolvimento de um produto de biocontrole com base nos esporos de *C. rosea*. Testes com outros tipos de formulações e carreadores podem ser feitos com intuito de manter a viabilidade e a eficácia dos esporos elevadas e estáveis por mais tempo, de preferência através de um armazenamento sem refrigeração.

Outro ponto importante é a validação da correlação entre o resultado do teste de titulação e a eficácia dos esporos de *C. rosea* a campo, para poder recomendar o teste de titulação como um teste totalmente confiável e rotineiro para laboratório.

Além disso, precisam ser feitos estudos a campo para estabelecer relações dose-resposta entre os esporos formulados e armazenados de *C. rosea* e a porcentagem de controle de *B. cinerea*, em comparação com curvas dose-resposta para esporos recém produzidos de *C. rosea*. Assim, será possível analisar se a eficácia de controle é reprodutível para ambos os esporos e se os esporos armazenados são tão eficazes quanto os esporos recém produzidos.

Também seria interessante realizar alguns testes com *C. rosea* visando comprovar que ele não causa nenhuma toxicidade às pessoas, principalmente no que se refere à ingestão. Esse tipo de resultado ajudará a romper quaisquer barreiras de rejeição que o produto possa receber pelos consumidores, os quais, por falta de conhecimento, muitas vezes preferem comer frutos com alto índice de resíduos de agroquímicos do que frutos saudáveis que receberam somente tratamentos biológicos. Além disso, testes de toxicidade são exigidos pelo Governo para o registro e comercialização mesmo para produtos biológicos.

6.2 POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA E EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Clonostachys rosea*

Outra contribuição deste trabalho foi a caracterização química de uma galactomanana que aparece tanto na parede celular quanto no caldo de cultivo durante FLS de *C. rosea*. Esse polissacarídeo é similar aos polissacarídeos que têm sido relatados para outros fungos da família a que *C. rosea* pertence.

Além disso, com base nestes resultados e nos dados obtidos em duas FLS com teores iniciais de glucose distintos, sugere-se que o EPS corresponde a um componente da parede celular que foi liberado durante o processo de autólise do micélio em níveis baixos de glucose.

A principal sugestão para estudos futuros nessa área é a caracterização da função destas galactomananas nos mecanismos de reconhecimento ou de invasão entre parasita-hospedeiro, com ênfase no mecanismo de ação por micoparasitismo.

REFERÊNCIAS

AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; LEAL, J.A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; DOMENECH, J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Structural elucidation of acidic fungal polysaccharides isolated from the cell-wall of genera *Cylindrocladium* and *Calonectria*. **Carbohydrate Research**, v.303, p.67-72, 1997.

AHRAZEM, O.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; BARASOAÍN, I.; BERNABÉ, M.; LEAL, J.A. Structural characterization of a cell wall polysaccharide from *Penicillium vermoesenii*: chemotaxonomic application. **Canadian Journal of Botany**, v.77, p.961-968, 1999.

AHRAZEM, O.; LEAL, J.A.; PRIETO, A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Chemical structure of a polysaccharide isolated from the cell wall of *Arachniotus erruculosus* and *A. rubber*. **Carbohydrate Research**, v.336, p.325-328, 2001a.

AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; BERNABÉ, M.; LEAL, J.A. Comparison of cell-wall polysaccharides from *Nectria cinnabarina* with those from the group of *Nectria* with *Sesquicillium* anamorphs. **Microbiology**, v.147, p.1839-1849, 2001b.

AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; GIMÉNEZ-ABIÁN, M.A.; LEAL, J.A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Structural elucidation of fungal polysaccharides isolated from the cell wall of *Plectosphaerella cucumerina* and *Verticillium* spp. **Carbohydrate Research**, v.341, p.246-252, 2006.

BARNETT, H.L.; LILLY, V.G. (1962) A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum*. **Mycologia** 54:72-79

BATTA, Y.A. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. **Crop Protection**, v.23, p.19-26, 2004.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CÓDON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, p.249-260, 2004.

BERRIE, A. Botrytis, Powdery Mildew and Blackspot of Strawberry. **Proceedings of National Soft Fruit Conference**. TEAGASC – The Irish Agriculture and Food Development Authority Horticultural Research International, East Malling, UK, 2000.

BEZERRA, C.S. **Estrutura genética e sensibilidade a fungicidas de *Amphobotrys ricini*, agente causal do mofo cinzento da mamoneira**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 47f., Natal, 2007.

BOFF, P.; KRAKER, J.; GERLAGH, M.; KÖHL, J. The role of petals in development of grey mould in strawberries. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.76-83, 2003.

BRAR, S.K.; VERMA, M.; TYAGI, R.D.; VALÉRO, J.R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, v.41, p.323–342, 2006.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v.131, p.209-217, 1984.

CLIQUET, S.; SCHEFFER, J. Influence of culture conditions on growth and survival of conidia of *Trichoderma* spp. coated on seeds. **Biocontrol Science and Technology**, v.6, p.277-284, 1997.

CORDEIRO, L.M.C.; CARBONERO, E.R.; SASSAKI, G.L.; REIS, R.A.; WÖRGÖTTER, E.S.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. A fungus-type β -galactofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.244, p.193-198, 2005.

COTA, L.V., MAFFIA, L.A., MIZUBUTI, E.S.G. Brazilian isolates of *Clonostachys rosea*: colonization under different temperature and moisture conditions and temporal dynamics on strawberry leaves. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, p.312–317, 2008a.

COTA, L.V., MAFFIA, L.A., MIZUBUTI, E.S.G., F. MACEDO, P.E., ANTUNES, R.F. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biological Control**, v.46(3), p.515-522, 2008b.

DALL'ONDER, G.M. **Produção e eficiência de conídios e biomassa de *Gliocladium roseum* no controle de *Botrytis cinerea* em morangueiro**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 115f., Porto Alegre, 1997.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic Plant Pathology Methods**. 2ª Ed. Boca Raton: Lewis Publishers. 434 p., 1996.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

DUGAN, F.M.; LUPIEN, S.L.; HERNANDEZ-BELLO, M; PEEVER, T.L.; CHEN, W. Fungi resident in chickpea debris and their suppression of growth and reproduction of *Didymella rabiei* under laboratory conditions. **Journal of Phytopathology**, v.153, p.431-439, 2005.

FOKKEMA, N.J. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. **Pesticide Science**, v.37(4), p.411-416, 1993.

FRANCISCO, E.A.; MOCHI, D.A.; CORREIA, A.C.B.; MONTEIRO, A.C. Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural**, v.36(4), p. 1309-1312, 2006.

FRIER, C.; PEDERSEN, H.; KRISTENSEN, H.; HENDRIKSEN, N.B.; JENSEN, A.; JENSEN, D.F.; KNUDSEN, I.M.B. Development of *G. roseum* isolate IK726 / Udvikling af *G. roseum* isolat IK726. Udvikling af et biologisk bejdsemiddel til frø. **Miljøprojekt**, 463, 1999.

GANDER, J.E.; JENTOFT, N.H.; DREWES, L.R.; RICK, P.D. The 5-O- β -D-galactofuranosyl-containing exocellular glycopeptide of *Penicillium charlesii*. **Journal of Biological Chemistry**, v.249, p.2063-2072, 1974.

GANDER, J.E.; FANG, F. The occurrence of ethanolamine and galactofuranosyl residues attached to *Penicillium charlesii* cell wall saccharides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.71, p.719-725, 1976.

GOEDEGEBUUR, F.; FOWLER, T.; PHILLIPS, J.; van der KLEY, P.; van SOLINGEN, P.; DANKMEYER, L.; POWER, S.D. Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. **Current Genetics**, v.41, p.89-98, 2002.

GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; LEAL, J.A.; AHRAZEM, O.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Differences among the cell wall galactomannans from *Aspergillus wentii* and *Chaetosartorya chrysella* and that of *Aspergillus fumigatus*. **Glycoconjugate Journal**, v.20, p.239-246, 2004.

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v.53, p.1212–1223, 1975

GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. **Carbohydrate Research**, v.142, p.253-267, 1985.

GUTIÉRREZ, A.; PRIETO, A.; MARTINEZ, A.T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**, v.281, p.143-154, 1996.

HORACZEK, A.; VIERNSTEIN, H. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v.31, p.65-71, 2004.

HYNES, R.K.; BOYETCHKO, S.M. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.845–849, 2006.

INGLIS, G.D.; KAWCHUK, L.M. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, p.60-70, 2002.

IRTWANGE, S.V. Application of biological control agents in pre- and postharvest operations. **Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal**, v.8(3), p.1-12, 2006.

JAMES, T.D.W.; SUTTON, J.C. Biological control of *Botrytis* leaf blight of onion by *Gliocladium roseum* applied as sprays and with fabric applications. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p.265-275, 1996.

JANSSON, P.E.; LINDBER, G.B. Structural studies of varianose. **Carbohydrate Research**, v.82, p.97-102, 1980.

JENKINS, N.E.; HEVIEFO, G.; LANGEWALD, J.; CHERRY, A.J.; LOMER, C.J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**, v.19(1), p.21N-31N, 1998.

JENSEN, B.; KNUDSEN, I.M.B.; MADSEN, M.; JENSEN, D.F. Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. **Phytopathology**, v.94, p.551-560, 2004.

JENSEN, D.F.; KNUDSEN, I.M.B.; LÜBECK, M.; MAMARABADI, M.; HOCKENHULL, J.; JENSEN, B. Development of a biocontrol agent for plant disease control with special emphasis on the near commercial fungal antagonist *Clonostachys rosea* strain 'IK726'. **Australasian Plant Pathology**, v.36(2), p.95-101, 2007.

JENSEN, B.; KNUDSEN, I.M.B.; JENSEN, D.F. Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.233-242, 2000.

JENSEN, B.; KNUDSEN, I.M.B.; JENSEN, D.F. Survival of conidia of *Clonostachys rosea* on stored barley seeds and their biocontrol efficacy against seed-borne *Bipolaris sorokiniana*. **Biocontrol Science and Technology**, v.12, p.427-441, 2002.

JOHANSEN, A.; KNUDSEN, I.M.B.; BINNERUP, S.J.; WINDING, A.; JOHANSEN, J.E.; JENSEN, L.E.; ANDERSEN, K.S.; SVENNING, M.M.; BONDE, T.A. Non-target effects of the microbial control agents *Pseudomonas fluorescens* DR54 and *Clonostachys rosea* IK726 in soils cropped with barley followed by sugar beet: a greenhouse assessment. **Soil Biology & Biochemistry**, v.37, p.2225-2239, 2005.

KEINATH, A.P.; FRAVEL, D.R.; PAPAIVISAS, G.C. Potential of *Gliocladium roseum* for biocontrol of *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**, v.81, p.644-648, 1991.

KLIS, F.M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.239-256, 2002.

KNUDSEN, I.M.B.; THOMSEN, K.A.; JENSEN, B.; POULSEN, K.M. Effects of hot water treatment, biocontrol agents, disinfectants and a fungicide on storability of English oak acorns and control of the pathogen, *Ciboria batschiana*. **Forest Pathology**, v.34, p.47-64, 2004.

KOHL, J.; BÉLANGER, R.R.; FOKKEMA, N.J. Interaction of four antagonistic fungi with *Botrytis aclada* in dead onion leaves: a comparative microscopic and ultrastructural study. **Phytopathology**, v.87, p.634-42, 1997.

KOVACH, J.; PETZOLDT, R.; HARMAN, G.E. Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to strawberries for *Botrytis* control. **Biological Control**, v.18, p.235-242, 2000.

KRAUSS, U.; SOBERANIS, W. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod diseases. **Biological Control**, v.24, p.82-89, 2002.

LEAL, J.A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; DOMENECH, J.; BERNABÉ, M. Structural investigation of a cell-wall galactomannan from *Neurospora crassa* and *N. sitophila*. **Carbohydrate Research**, v.283, p.215-222, 1996.

LEAL, J.A.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; PRIETO, A.; DOMENECH, J.; AHRAZEM, O.; BERNABÉ, M. Possible chemotypes from cell wall polysaccharides, as an aid in the systematics of *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. **Mycological Research**, v.101, p.1259-1264, 1997.

LEGARD, D.E.; MERTELY, J.C. Botrytis fruit rot (gray mold) and flower blight of strawberry. **PP-172 Plant Pathology Department**, Gulf Coast Research and Education Center – Dover, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2000. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>

LEVERY, S.B.; TOLEDO, M.S.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K. Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: an immunodominant β -galactofuranose residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen. **Biochemistry**, v.37, p.8764-8775, 1998.

LI, G.Q.; HUANG, H.C.; KOKKO, E.G.; ACHARYA, S.N. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.43, p.211-218, 2002.

LI, G.Q.; HUANG, H.C.; ACHARYA, S.N.; ERICKSON, R.S. Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. **Plant Disease**, v.88, p.1246-1251, 2004.

LI, J.; YANG, J.; HUANG, X.; ZHANG, K. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. **Process Biochemistry**, v.41, p.925-929, 2006.

LÜBECK, M.; KNUDSEN, I.M.B.; JENSEN, B.; THRANE, U.; JANVIER, C.; JENSEN, D.F. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. **Mycological Research**, v.106, p.815-826, 2002.

MICHEREFF, S.J.; NORONHA, M.A.; ROCHA JR, O.M.; SILVA, J.A.; MIZUBUTI, E.S.G. Variabilidade de Isolados de *Alternaria brassicicola* no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v.28(6), p.656-663, 2003.

MØLLER, K.; JENSEN, B.; PALUDAN ANDERSEN, H.; STRYHN, H.; HOCKENHULL, J. Biocontrol of *Pythium tracheiphilum* in Chinese cabbage by *Clonostachys rosea* under field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v.13, p.171-182, 2003.

MONTESINOS, E. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. **International Microbiology**, v.6, p.245-252, 2003.

MOORE, D.; DOURO-KPINDOU, O.K.; JENKINS, N.E.; LOMER, C.J. Effects of moisture and temperatures on storage of *Metarhizium flavoviride* conidia. **Biocontrol Science and Technology**, v.6, p.51-61, 1996.

MORANDI, M.A.B.; SUTTON, J.C.; MAFFIA, L.A. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.439-448, 2000.

MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A.; SUTTON, J.C. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. **Phytoparasitica**, v.29, p.103-113, 2001.

MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; ALFENAS, A.C.; BARBOSA, J.G. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. **Biological Control**, v.26, p.311-317, 2003.

MORANDI, M.A.B.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; ALFENAS, A.C.; BARBOSA, J.G.; CRUZ, C.D. Relationships of microclimatic variables to colonization of rose debris by *Botrytis cinerea* and the biocontrol agent *Clonostachys rosea*. **Biocontrol Science and Technology**, v.16, p.619-630, 2006.

MORANDI, M.A.B.; MATTOS, L.P.V.; SANTOS, E.R.; BONUGLI, R.C. Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. **Crop Protection**, v.27, p.77-83, 2008.

MORIN, L. Mass-production of fungi for bioherbicides. **Plant Protection Quarterly**, v.7(4), p.143-148, 1992.

MUÑOZ, G.A.; AGOSIN, E.; COTORAS, M.; SAN MARTIN, R.; VOLPE, D. Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.125, p.63-70, 1995.

NOBRE, S.A.M.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E.S.G.; COTA, L.V.; DIAS, A.P.S. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v.34, p.132-143, 2005.

ODDS, F.C.; BROWN, A.J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v.11, p.272-279, 2003.

OKUDA, T.; KOHNO, J.; KISHI, N.; ASAI, Y.; NISHIO, M.; KOMATSUBARA, S. Production of TMC- 151, TMC- 154 and TMC- 171, a new class of antibiotics, is specific to "*Gliocladium roseum*" group. **Mycoscience**, v.41, p. 239-253, 2000.

PARRA, E.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M.; LEAL, J.A.; PRIETO, A.; GÓMEZ-MIRANDA, B. Structural studies of fungal cell-wall polysaccharides from two strains of *Talaromyces flavus*. **Carbohydrate Research**, v.251, p.315-325, 1994.

PENG, G.; SUTTON, J.C. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.13, p.247-257, 1991.

PENG, G.; SUTTON, J.C.; KEVAN, P.G. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.14(2), p.114-129, 1992.

PERLIN, A.S.; CASU, B. Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-¹³C. **Tetrahedron Letters**, v.10, p.2921-2924, 1969.

PRIETO, A.; LEAL, J.A.; POVEDA, A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; GÓMEZ-MIRANDA, B.; DOMENECH, J.; AHRAZEM, O.; BERNABÉ, M. Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species. **Carbohydrate Research**, v.304, p.281-291, 1997.

PRIETO, A.; LEAL, J.A.; GIMÉNEZ-ABIÁN, M.I.; CANALES, A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; BERNABÉ, M. Isolation and structural determination of a unique polysaccharide containing mannofuranose from the cell wall of the fungus *Acrosporum compressum*. **Glycoconjugate Journal**, v.24, p.421-428, 2007.

PRIETO, A.; LEAL, J.A.; BERNABÉ, M.; HAWKSWORTH, D.A. A polysaccharide from *Lichina pygmaea* and *L. confines* supports the recognition of Lichinomycetes. **Mycological Research**, v.112, p.381-388, 2008.

RAVNSKOV, S.; JENSEN, B.; KNUDSEN, I.M.B.; BØDKER, L.; JENSEN, D.F.; KARLIŃSKI, L.; LARSEN, J. Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.3453-3462, 2006.

REIS, E.M.; RICHTER, R.L. Efeito de substratos sobre a germinação de uredosporos e comprimento de tubos germinativos de *Puccinia triticina*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32(1), p.75-78, 2007.

ROSADO, I.V.; REY, M.; CODON, A.C.; GOVANTES, J.; MORENO-MATEOS M.A.; BENITEZ, T. QID74 cell wall protein of *Trichoderma harzianum* is involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces. **Fungal Genetics Biology**, v.44, p.950–964, 2007.

SAEMAN, J.F.; MOORE, W.E.; MITCHELL, R.L.; MILLET, M.A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tappi Journal**, v.37, p.336-343, 1954.

SALIGKARIAS, I.D.; GRAVANIS, F.T.; EPTON, H.A.S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: I. in vivo studies. **Biological Control**, v.25, p.143-150, 2002.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; SOUZA, L.M.; CZELUSNIAK, P.A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC–MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v.340, p.731-739, 2005a.

SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J. Methylation-GC-MS analysis of arabinofuranose- and galactofuranose-containing structures: rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, p.223-234, 2005b.

SCHMALHORST, P.S.; KRAPPMANN, S.; VERVECKEN, W.; ROHDE, M.; MULLER, M.; BRAUS, G.H.; CONTRERAS, R.; BRAUN, A.; BAKKER, H.; ROUTIER, F.H. Contribution of galactofuranose to the virulence of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic Cell**, v.7, p.1268–1277, 2008.

SCHROERS, H.J.; SAMUELS, G.J.; SEIFERT, K.A.; GAMS, W. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *G. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. **Mycologia**, v.91, p.365-385, 1999.

SHINGEL, K.I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. **Carbohydrate Research**, v.339, p.447-460, 2004.

SILVA, M.L.C.; MARTINEZ, P.F.; IZELI, N.L.; SILVA, I.R.; VASCONCELOS, A.F.D.; CARDOSO, M.S; STELUTTI, R.M.; GIESE, E.C.; BARBOSA, A.M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v.29(1), p.85-92, 2006.

SLAMENOVÁ, D.; LÁBAJ, J.; KRIZKOVÁ, L.; KOGAN, G.; SANDULA, J.; BRESGEN, N.; ECKL, P. Protective effects of fungal (1→3)-beta-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. **Cancer Letters**, v.198(2), p.153-60, 2003.

SMITS, G.J.; van den ENDE, H.; KLIS, F.M. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. **Microbiology**, v.147, p.781-794, 2001.

STYNEN, D.; SARFATI, J.; GORIS, A.; PRÉVOST, M.C.; LESOURD, M.; KAMPHUIS, H.; DARRAS, V.; LATGÉ, J.P. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* galactomannan. **Infection and Immunity**, v.60, p.2237-2245, 1992.

SURGEONER, G. **Pest Management Research – Plant Program**. University of Guelph – Presented to the Agricultural Research of Ontario, 162p., 1998.

SUTTON, J.C.; LI, DE-WEI; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, Ontário, v.81, p.316-328, 1997.

SUTTON, J.C.; LIU, W.; HUANG, R.; OWEN-GOING, N. Ability of *Clonostachys rosea* to establish and suppress sporulation potential of *Botrytis cinerea* in defoliated stems of hydroponic greenhouse tomatoes. **Biocontrol Science and Technology**, v.12(4), p.413-425, 2002.

SUTTON, J.C.; PENG, G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology**, v.83, p.15-621, 1993

SUZUKI, E.; TOLEDO, M.S.; TAKAHASHI, H.K.; STRAUS, A.H. A monoclonal antibody directed to terminal residue of β -galactofuranose of glycolipid antigen isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*: cross-reactivity with *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi*. **Glycobiology**, v.7, p.463-468, 1997.

TOLEDO, A.V.; VIRLA, E.; HUMBER, R.A.; PARADELL, S.L.; LASTRA, C.C.L. First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.92, p.7-10, 2006.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; SUTTON, J. C.; PERAZZOLO, I.; CZERMAINSKI, A. B. C. Controle biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v.22(1), p.69-73, 1997.

VANHOOREN, P.T.; VANDAMME, E.J.J. L-Fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.74, 479-497, 1999.

VERMA, M.; BRAR, S.K.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y.; VALÉRO, J.R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v.37 p.1-20, 2007.

VICCINI, G. **Otimização da produção de esporos do fungo *Clonostachys rosea* – um biopesticida para a cultura do morangueiro**. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, 132f., Curitiba, 2004.

VICCINI, G.; MANNICH, M.; CAPALBO, D.M.F.; ROSA, A.S.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.; MITCHELL, D. A. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. **Process Biochemistry**, v.42, p.275-278, 2007.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, p.258-274, 2002.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v.2, p.65-68, 1963a.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v.2, p.211-215, 1963b.

XUE, A.G. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. **Phytopathology**, v.93, p.329-335, 2003.

YU, H.; SUTTON, J.C. Effectiveness of Bumblebees and Honeybees for delivering inoculum of *Gliocladium roseum* to raspberry flowers to control *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v.10, p.113-122, 1997.

ZHAO, M.L.; HUANG, J.S.; MO, M.H.; ZHANG, K.Q. A potential virulence factor involved in fungal pathogenicity: serine-like protease activity of nematophagous fungus *Clonostachys rosea*. **Fungal Diversity**, v.19, p.217-234, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i> EM MAÇÃS - DIÂMETRO MÉDIO DAS LESÕES CAUSADAS POR <i>B. cinerea</i> \pm ERRO PADRÃO.....	133
APÊNDICE 2 - ANÁLISES DE CORRELAÇÃO ENTRE OS TESTES DE VIABILIDADE E DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE <i>Clonostachys rosea</i>	134
APÊNDICE 3 - ESPECTROS DE HMQC DAS FRAÇÕES 1000E-BP E 1000E-EPS.....	137
APÊNDICE 4 - PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO K2 - EXTRAÇÃO ALCALINA DOS POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA.....	139

APÊNDICE 1 – TESTE DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea* EM
MAÇÃS – DIÂMETRO MÉDIO DAS LESÕES CAUSADAS POR *B.*
cinerea ± ERRO PADRÃO

FES-1

Armazenamento	Diâmetro médio das lesões causadas por <i>B. cinerea</i> (cm)						
	CA	CF	TA	TF	MA	MF	Água
15 dias	–	–	–	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,2	0,6 ± 0,9	4,0 ± 1,2
30 dias	0,1 ± 0,3	–	–	–	–	–	3,4 ± 1,1
60 dias	–	–	0,2 ± 0,4	–	–	–	2,1 ± 0,3
90 dias	0,4 ± 0,6	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,6	–	–	0,3 ± 0,6	2,2 ± 0,6
120 dias	0,2 ± 0,3	0,3 ± 0,7	–	0,3 ± 0,5	0,2 ± 0,5	0,2 ± 0,3	2,7 ± 0,9
150 dias	0,5 ± 0,6	0,9 ± 0,8	1,8 ± 0,4	1,4 ± 0,3	0,6 ± 0,4	0,7 ± 0,6	4,7 ± 0,4

FES-2

Armazenamento	Diâmetro médio das lesões causadas por <i>B. cinerea</i> (cm)						
	CA	CF	TA	TF	MA	MF	Água
15 dias	3,1 ± 0,4	0,6 ± 0,8	–	0,6 ± 0,9	0,8 ± 1,2	0,8 ± 1,2	3,4 ± 0,2
30 dias	3,4 ± 0,4	–	–	–	–	–	3,3 ± 0,3
60 dias	–	–	–	–	–	–	2,4 ± 0,4
90 dias	–	0,8 ± 0,2	1,3 ± 1,1	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,7	0,6 ± 0,6	2,7 ± 0,7
120 dias	3,5 ± 1	0,6 ± 0,7	3,2 ± 1,4	3,5 ± 1	2 ± 1	1,6 ± 0,3	3,4 ± 1,3
150 dias	3,7 ± 0,8	1,7 ± 0,7	3,3 ± 1,1	3,8 ± 1,2	3,7 ± 1,4	1,9 ± 0,1	4,1 ± 0,2

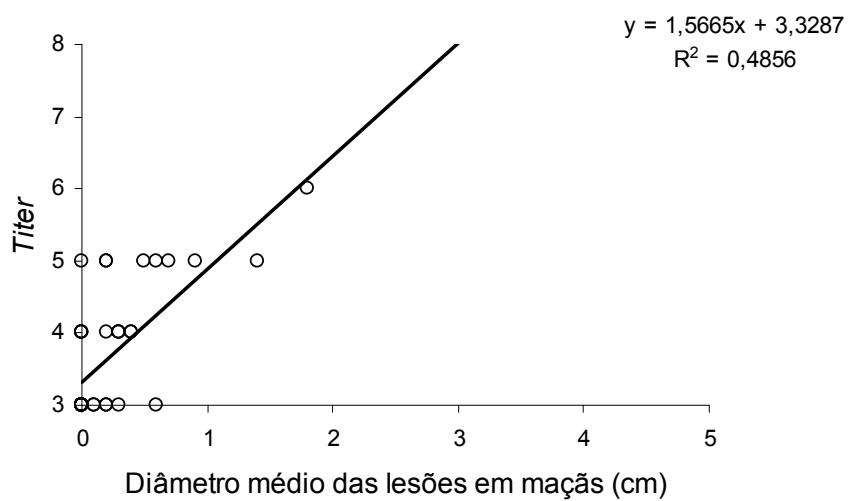
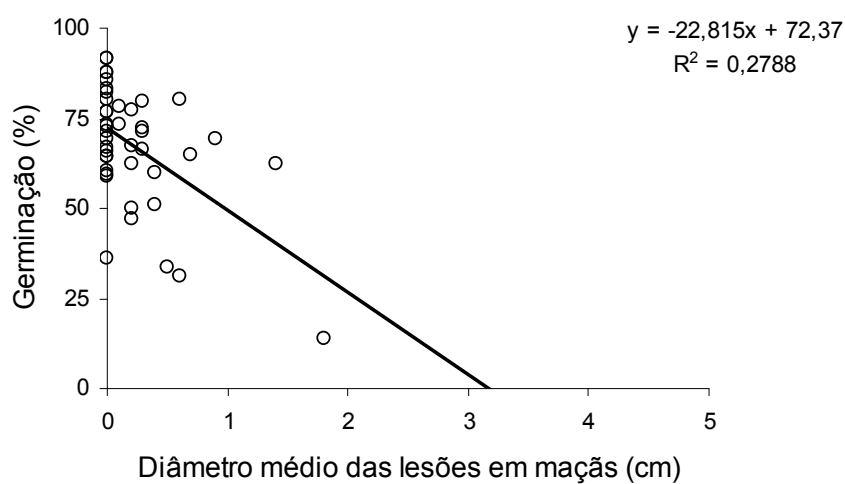
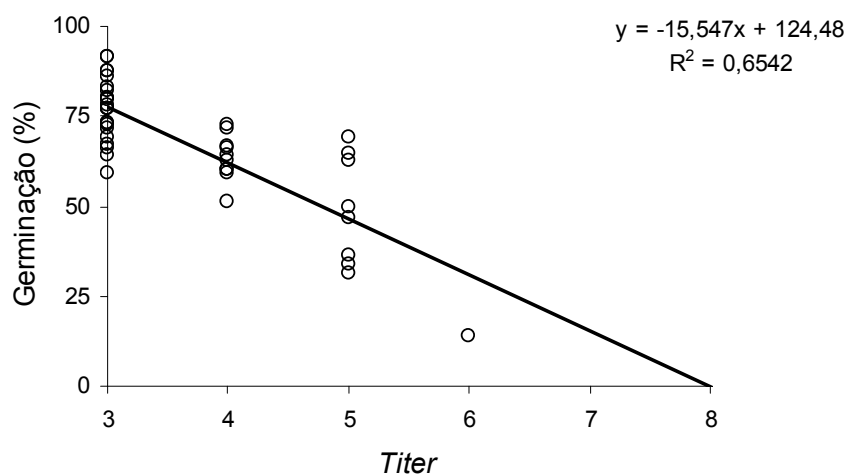
FES-3

Armazenamento	Diâmetro médio das lesões causadas por <i>B. cinerea</i> (cm)						
	CA	CF	TA	TF	MA	MF	Água
15 dias	0,9 ± 1,3	0,3 ± 0,5	0,9 ± 0,7	0,3 ± 0,7	0,2 ± 0,4	–	4,2 ± 1
30 dias	0,1 ± 0,3	–	0,3 ± 0,3	–	–	–	3,8 ± 1,3
60 dias	0,2 ± 0,4	–	–	–	–	–	3,7 ± 1,2
90 dias	2,9 ± 0,4	–	1,2 ± 0,6	–	–	–	3,0 ± 0,4
120 dias	2,7 ± 0,4	0,1 ± 0,3	3,5 ± 1	0,6 ± 1	0,2 ± 0,6	0,3 ± 0,5	3,3 ± 0,8
150 dias	3,8 ± 0,9	1,4 ± 0,3	4,2 ± 0,1	0,8 ± 0,9	1,8 ± 0,2	0,7 ± 0,7	4,2 ± 0,2

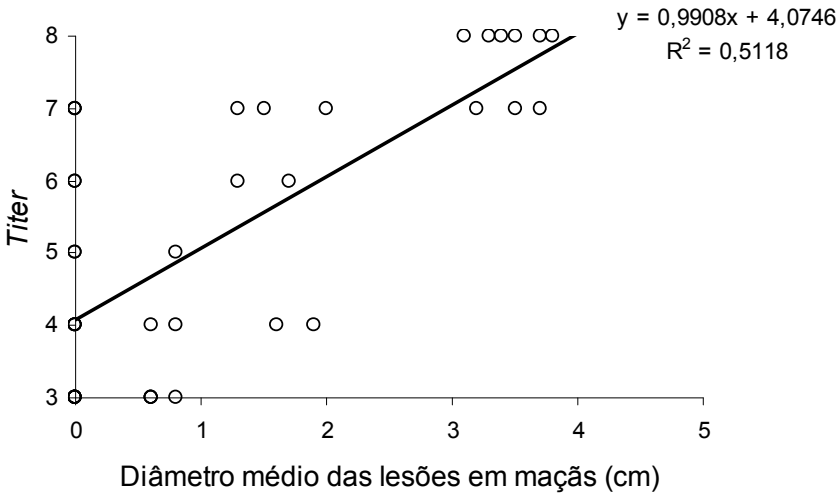
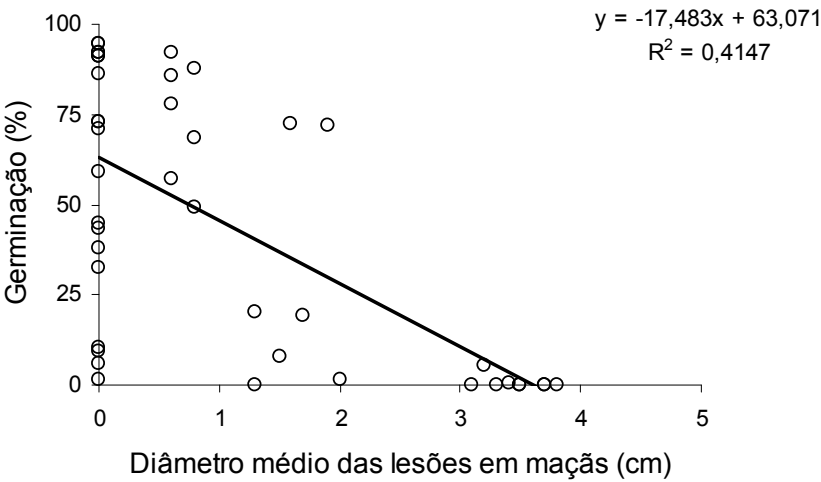
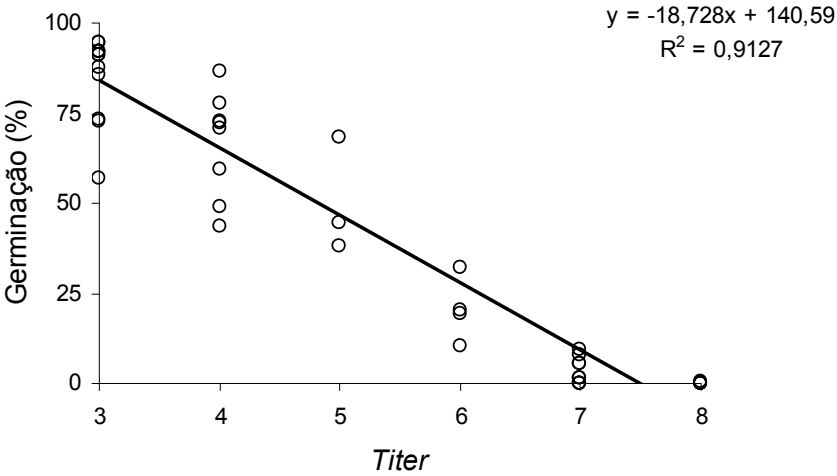
– Não foram observadas lesões nas maçãs.

APÊNDICE 2 – ANÁLISES DE CORRELAÇÃO ENTRE OS TESTES DE VIABILIDADE E DE EFICÁCIA DOS ESPOROS DE *Clonostachys rosea*

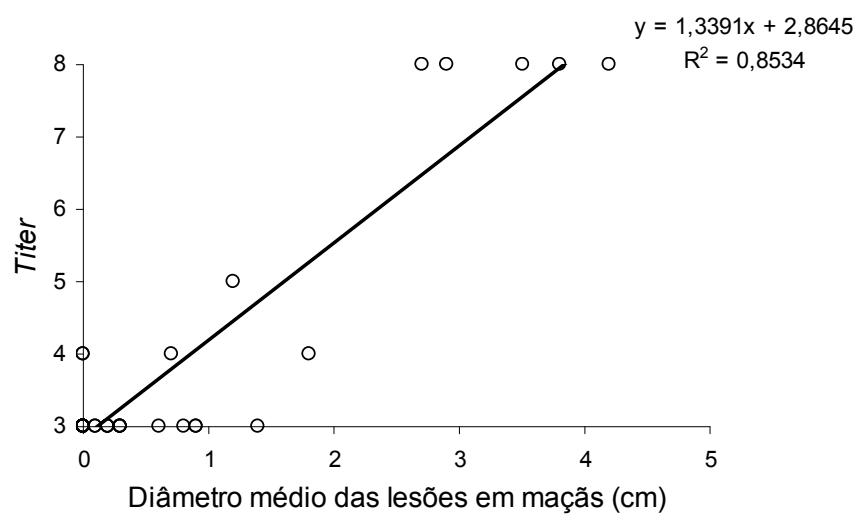
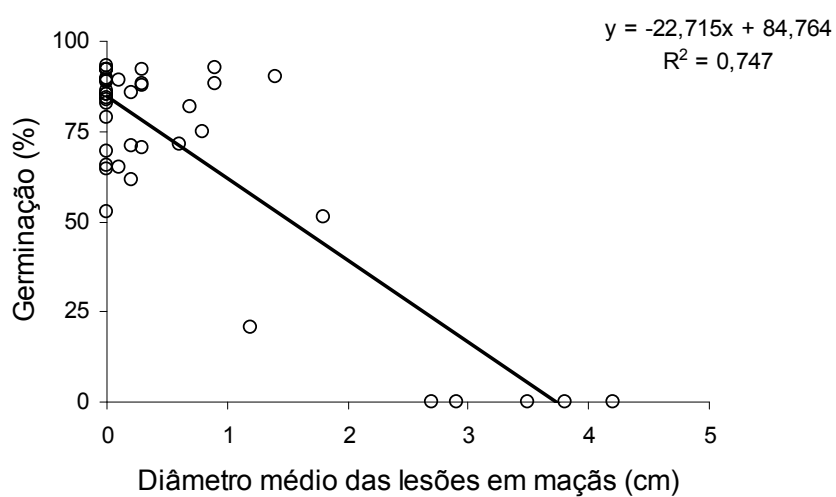
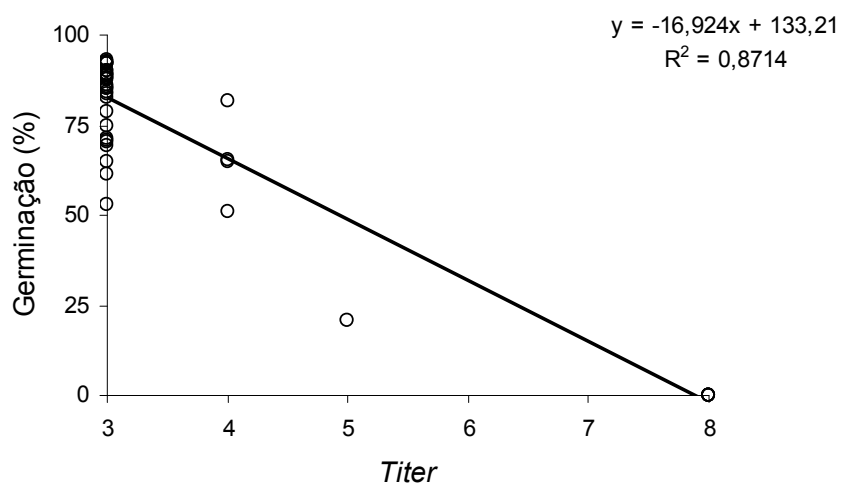
Correlação entre testes de viabilidade e de eficácia dos esporos para FES-1.



Correlação entre testes de viabilidade e de eficácia dos esporos para FES-2.

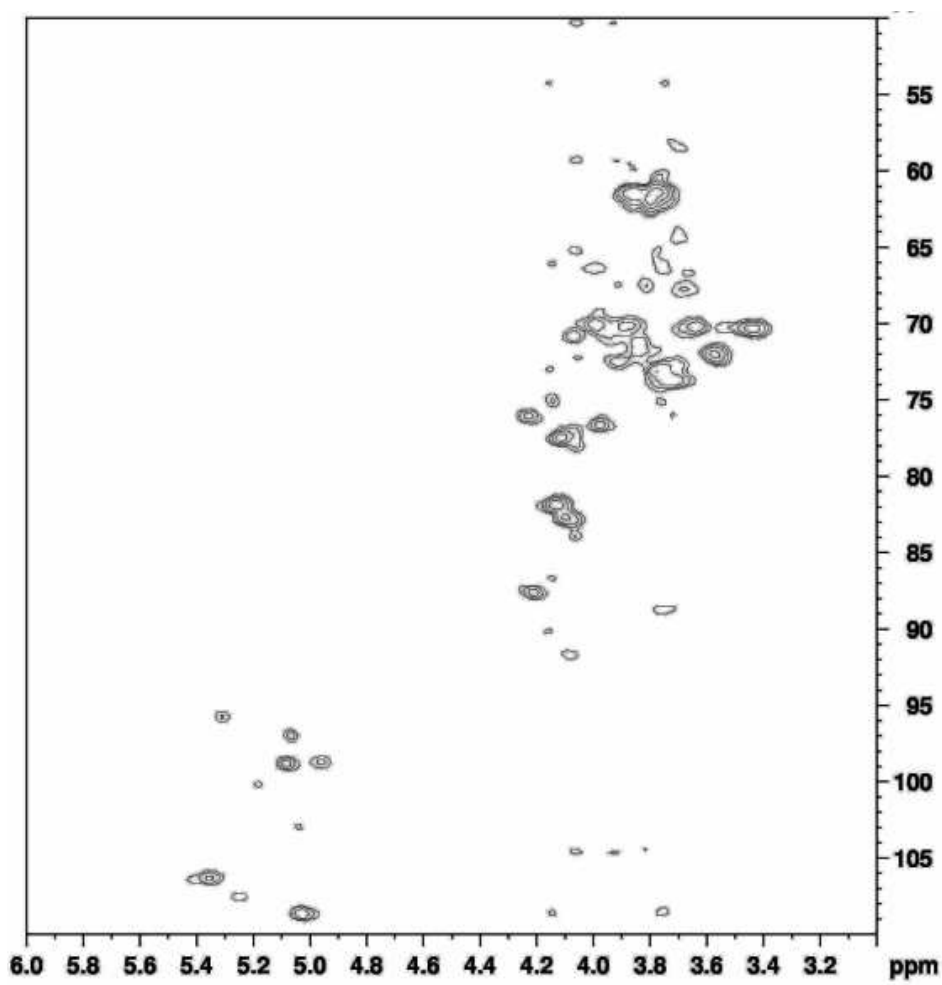


Correlação entre testes de viabilidade e de eficácia dos esporos para FES-3.

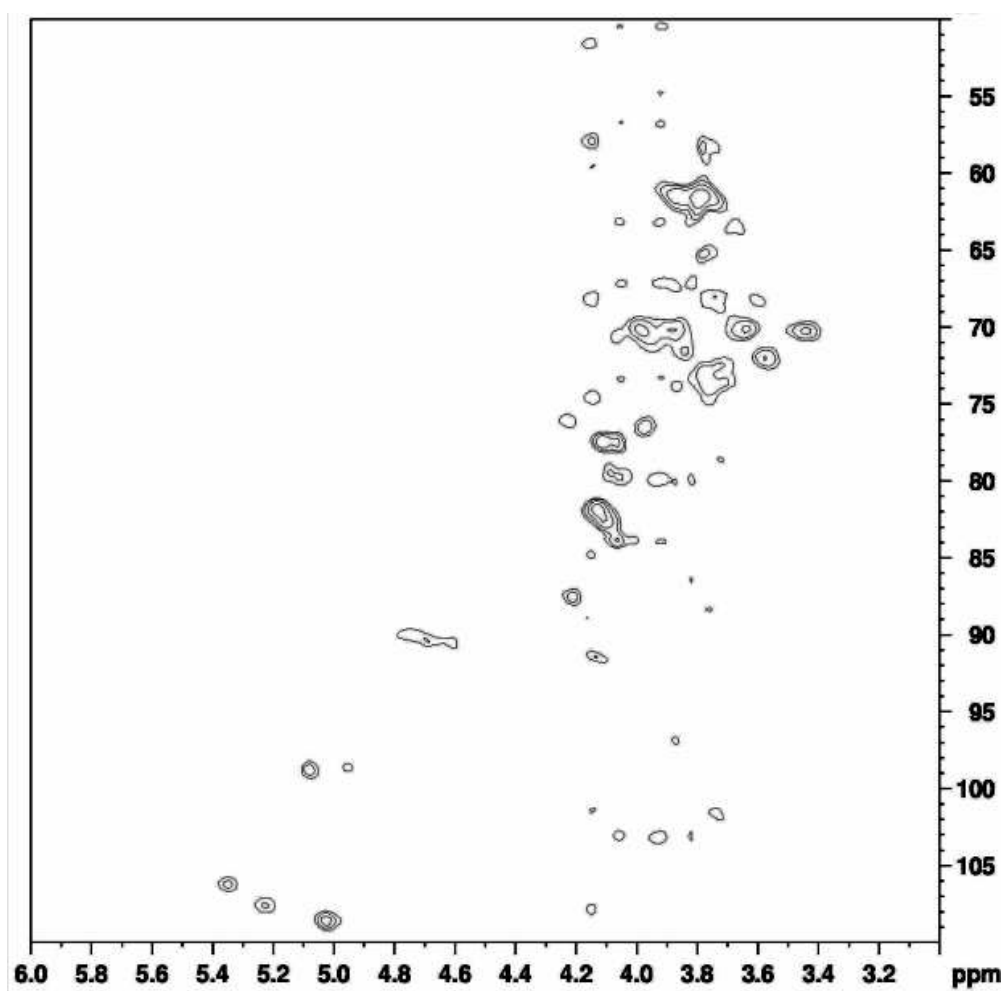


APÊNDICE 3 – ESPECTROS DE HMQC DAS FRAÇÕES 1000E-BP E 1000E-EPS

Fração 1000E-BP



Fração 1000E-EPS



APÊNDICE 4 – PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO K2 - EXTRAÇÃO ALCALINA DOS POLISSACARÍDEOS DA BIOMASSA

COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, EM VÁRIOS ESTÁGIOS DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO, DA FRAÇÃO K2 OBTIDA ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO ALCALINA DA BIOMASSA DE *Clonostachys rosea*

Frações	Polissacarídeo da biomassa (Extração alcalina)	
	Sigla	Man:Gal:Glc (%) ^a
Precipitado	P-K2	14:26:60
Sobrenadante	S-K2	10:15:75
Sobrenadante de congelamento-degelo	SS-K2	17:31:52
Precipitado de congelamento-degelo	PS-K2	14:24:62

^a Analisado em CG-EM após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

ANEXOS

ANEXO 1 - BULA DOS PRODUTOS COMERCIAIS CLONOSNAT PM [®] E CLONOSNAT EF [®]	141
ANEXO 2 - BULA DO PRODUTO COMERCIAL ENDOFINE [®]	145

ANEXO 1 – BULA DOS PRODUTOS COMERCIAIS CLONOSNAT PM® E CLONOSNAT EF®

1) Clonosnat PM - A base do fungo *Clonostachys rosea*, promove o controle biológico de *Botrytis cinerea*

Clonosnat EF - A base do fungo *Clonostachys rosea*, promove o controle biológico de *Botrytis cinerea*. Em conjunto com Clonosnat PM é um bioativador do processo de germinação do fungo, e pode ser aplicado foliarmente.

É necessário e obrigatório o uso junto ao Clonosnat PM para que o produto tenha efeito



Informações

CLONOSNAT				
Composição	Modo de usar	Benefícios	Compatibilidade	Precauções
COMPOSIÇÃO	Esporos do fungo <i>Clonostachys rosea</i>			

CLONOSNAT

Composição	Modo de usar	Benefícios	Compatibilidade	Precauções
------------	--------------	------------	-----------------	------------

MODO DE USAR

Preparo da calda:

1.O Pulverizador deve estar bem limpo e sem resíduos de inseticidas ou outros produtos químicos. Para limpar o mesmo, lave com água e sabão ou Solupan e enxague utilizando água limpa sem cloro.
2.Dissolva o produto em um balde antes de colocar no pulverizador.
3.Agite e deixe descansar por 1 minuto; a parte inerte(amido) decantará para o fundo do balde, esse procedimento fará com que todos os esporos do fungo fiquem liberados na água.

Coloque a água do balde no pulverizador e complete com água (sem cloro) até o volume desejado para pulverização. Repita a operação 3 vezes para se retirar o máximo possível de esporos do produto, o material depositado no fundo do balde pode ser usado como adubo ou espalhado manualmente na cultura onde se está aplicando o produto.

Após diluído, a aplicação do produto deve ser imediata, não se pode armazenar a calda nem misturar o CLONOSNAT PM com produtos químicos como adubos sintéticos, inseticidas ou fungicidas.

Alguns produtos são compatíveis como; biofertilizantes. Sempre consulte a Natural Rural para a aplicação de produtos em conjunto.

Para uma melhor eficiência do produto, o ideal em caso de aplicações foliares, é utilizar CLONOSNAT PM + CLONOSNAT EF.

CLONOSNAT EF é um acelerador orgânico constituído de metabólitos de *Clonostachys rosea* + extratos vegetais bioativos, que estimulam a ação do fungo, compete uma melhor aderência do produto sobre o inseto e acelera seu processo de ação.

CLONOSNAT

Composição	Modo de usar	Benefícios	Compatibilidade	Precauções
------------	--------------	------------	-----------------	------------

MODO DE USAR

Dosagens - Solo/Substrato/Semente

Solo	Conteíores	Culturas Anuais	Sementes	Substrato
3 a 4 Kg/ha/ano	5 a 10g/m ² de área antes do plantio	2 a 4 aplicações	5 a 10g/Kg de semente	3 a 4 Kg/m ³ de substrato ou esterco

Dosagens - Foliar

Opinão Correl [20L]	Hectare	Culturas Perenes	Culturas Anuais
50g de Clonosnat pm + 50ml de Clonosnat ef	2 a 4Kg de Clonosnat pm + 2 a 4L de Clonosnat ef	3 a 6 aplicações anuais	2 a 5 aplicações durante o ciclo

Durante o período seco o volume de água deverá ser superior a 600L/hectare.
Durante o período chuvoso o volume de água deverá ser superior a 200L/hectare

Em todas as dosagens sempre consulte o departamento técnico da Natural Rural

CLONOSNAT				
Composição	Modo de usar	Benefícios	Compatibilidade	Precauções
BENEFÍCIOS	O esporo do fungo <i>Clonostachys rosea</i> nas primeiras duas horas em contato com a água, se hidrata e começa a germinar, o ideal é que em aplicações foliares o produto tenha contato com as partes afetadas da planta antes da germinação do esporo do <i>Clonostachys rosea</i> .			
	Em aplicações foliares, sempre utilize CLONOSNAT EF para melhor eficiência.			
	O que poderá ser observado: <i>Clonostachys rosea</i> é um controlador natural de <i>Botrytis cinerea</i> , o seu uso constante fará com que o produtor observe a diminuição de danos causados pelo <i>Botrytis cinerea</i> . Devido a esse fator, o uso do CLONOSNAT deve ser sempre preventivo, devido a atividade biológica do fungo ocorrer em média 7 dias após a aplicação, o produtor não deve esperar que a doença atinja níveis de dano econômico para depois utilizar o produto.			

CLONOSNAT				
Composição	Modo de usar	Benefícios	Compatibilidade	Precauções
COMPATIBILIDADE	Consultar nosso departamento técnico			

CLONOSNAT				
Composição	Modo de usar	Benefícios	Compatibilidade	Precauções
PRECAUÇÕES	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicar com umidade relativa do ar superior a 50% para uma melhor eficiência do produto. - Sempre que possível aplicar após a chuva, sua eficiência é muito maior. - Aplicar após às 17:00hs, o sereno propicia uma boa umidade do ar, e, temperaturas amenas favorecem o bom desenvolvimento do fungo . - Mantenha a temperatura da água de aplicação entre 22°C e 33°C. A água não deve conter cloro. - Conservar o produto em local seco e fresco. A temperatura de armazenamento não deve ultrapassar 28°C, CLONOSNAT PM possui tecnologia avançada e não necessita de refrigeração para armazenamento. - Durante a aplicação, o equipamento de pulverização deve ser mantido em agitação constante. - Não deixe o produto exposto ao sol durante o transporte até o local da aplicação, principalmente em porta-malas de veículos estacionados sob o sol forte. 			
	Produto sujeito à variação de cor e consistência em função de safra			

http://www.naturalrural.com.br/produtos/produtos_especificos.asp?CodProduto=242&Caption=Clonosnat%20PM

ANEXO 2 – BULA DO PRODUTO COMERCIAL ENDOFINE®

EndoFine®

Naturally Occurring Plant Endophyte

General Information:

EndoFine® is a naturally occurring endophytic inoculant that colonizes plant tissue and establishes a symbiotic relationship with plants that contributes to improved plant health, uptake of nutrients and a reduction of environmental stress. The organism in EndoFine is present in all fields, but in insufficient numbers to effectively colonize all plants. The addition of EndoFine reestablishes a normal relationship with plant roots, stems and leaves that results in a more efficient uptake and use of nutrients, thereby allowing for greater growth and yield potential.

Ingredients:

<i>Clonostachys rosea</i> Strain (2 x 10 ⁷ viable cfu/gram).....	15%
Sterile carrier.....	85%
	100%

NOT A PLANT FOOD INGREDIENT

Best Before.....
Carefully read label directions

Net Contents: 800 grams (28.16 oz.)

Patent Pending

Lot # _____

APPLICATIONS AND RATES

Avoid tank mixing with fungicides, insecticides, herbicides or fertilizers as these may reduce the effect of EndoFine.

Foliar Spray and Wound Treatment:

Add 10 to 20 grams of EndoFine to one liter or 1 to 2.5 oz. of EndoFine to each gallon of water and apply as a fine spray. Use the lower rates when applying to freshly wounded/pruned (easy to colonize) tissue.

Field Sprayer:

Mix 1200 grams of EndoFine in 76 liters of water or 40 oz. of EndoFine in 20 gallons of water per acre. Apply in the evening. No rainfall or irrigation should occur within 8 hours to allow colonization.

Seed and Seedling Drench:

Add 10 to 20 grams (1 - 2.5 oz.) per 100 sq. meters (1000 sq.ft.) and water in thoroughly, or, use 10 - 20 grams per liter (1 - 2.5 oz. / gal.) water as drench to plant cubes at 100 mls. or 3.5 oz. / 4 inch cube.

Bulb & Cutting Dip:

All ornamentals and fresh cuttings may be coated with EndoFine prior to planting, or, bulbs and fresh cuttings may be dipped in a well mixed suspension of 15 grams per liter or 1.5 oz. per gallon of water.

Sylvan Bioproducts, Inc.
90 Glade Drive
Kittanning, PA 16201



Adjuvants Plus, Inc.
1755 Division Rd. N.
Kingsville, Ontario N9Y 2YB
CANADA

www.endofine.net

866-352-7520 U.S.
877-512-4659 CANADA

PRECAUTIONS

Keep out of reach of children. Avoid contact with skin and eyes. Wear NIOSH approved respirator when mixing. Wash hands after use. Do not store near food or feed.

DIRECTIONS FOR USE

EndoFine can be applied to foliage, flowers, seeds, roots, transplants, tubers, and plant wounds and can be applied as a spray, drench, and dust by dip immersion. In general, EndoFine performs better when superficial moisture is maintained on the tissues for at least 6 - 10 hours during the first 24 hours after application. Temperatures in the range of 67.2°F to 82.4°F are needed for best results. EndoFine may also be applied to leaves and flowers during the day when the weather is dull and heavily overcast.

Important: EndoFine may lose some of its effectiveness when exposed to direct sunlight or to prolonged drying. For best results on above-ground parts of plants, apply EndoFine during the evening to optimize conditions for the beneficial microflora during the humid period at night. Avoid applications during periods of full sunshine and low humidity.

STORAGE

Refrigerate at 35°F - 41°F. Keep in darkness in original container with lid closed. See "Use Before" date on label.

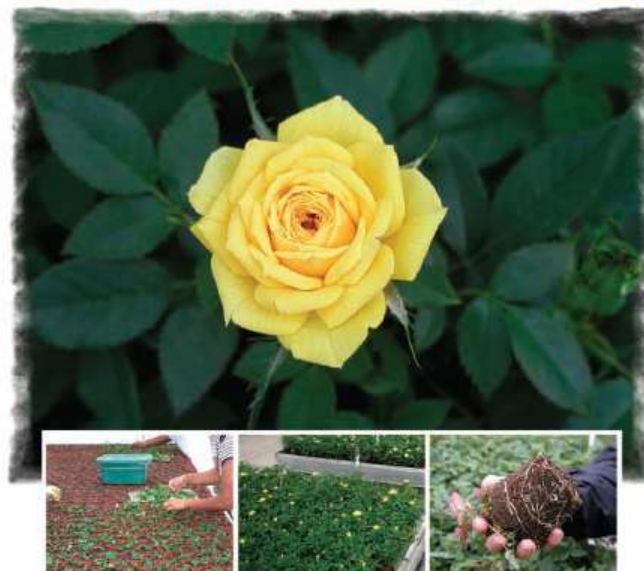
WARRANTY

Sylvan Bioproducts, Inc. and Adjuvants Plus, Inc. (the "Companies") warrants that this product conforms to the description on the label and is reasonably fit for the purposes referred to in the directions for use, subject to the factors noted above which are beyond the control of the Companies. The Companies make no other warranties or representations of any kind, express or implied, concerning the product, including no implied warranty of merchantability or fitness for any particular purpose, and no such warranty shall be implied by law. The exclusive remedy against the Companies for any cause of action relating to the handling or use of this product is a claim for damage and in no event shall damages or any other recovery of any kind against the Companies exceed the price of the product which caused the alleged loss, damage, injury or other claim. The Companies shall not be liable for, and any and all claims against the Companies are waived for, special, indirect, incidental, or consequential damages or expense of any nature, including, but not limited to, loss of profits or income.

EndoFine® is a registered trademark of
Adjuvants Plus Inc., Kingsville, Ontario, Canada

EndoFine®

Natural Nutrient Solubilizing Inoculant



Promotes improved plant health, vigorous growth and greater yield potential in the cultivation of roses.

Sylvan Bioproducts, Inc.

EndoFine®

Clonostachys rosea is a natural plant endophyte (plant living within another plant - in this case a beneficial fungus). It maintains a helpful association with the host plant tissues and grows locally near the sites of entry. It is not a systemic and has no harmful effects! The fungus grows rapidly in naturally senescent or stressed tissues and often sporulates. This new generation of spores allows continued long-term benefits in rose crops.

EndoFine is specifically beneficial in enabling rose plants to become more tolerant to common stress factors including insufficient or excess water, too high or low temperatures, low intensity light, the effects of chemicals, air pollutants and harmful microbes.

EndoFine is supplied as a dry powder and applied as a suspension in water following a specific protocol for rose crop production. Once mixed, it remains viable in the container in excess of 8 hours.

EndoFine is a naturally occurring endophytic nutrient-solubilizing inoculant that colonizes the plant tissue of roses and establishes a symbiotic relationship with the plants, contributing to improved plant health and a reduction in environmental stress.

The organism in **EndoFine**, *Clonostachys rosea*, is present in all fields, but in insufficient numbers to effectively colonize all plants.

The addition of **EndoFine** reestablishes a normal relationship with rose plant roots, stems and leaves that results in a more efficient uptake of nutrients. This allows for greater growth and yield potential.

The key advantages of **EndoFine** use when growing roses:

- Improves acquisition of otherwise unavailable or limited micronutrients
- Helps the plants maintain a good balance of hormonal activity
- Improves the natural resistance of plants to environmental stress factors



By dipping fresh cuttings in an **EndoFine** solution, the rapid colonization of *Clonostachys rosea* encourages vigorous and rapid root and shoot growth.



Spraying **EndoFine** after trimming promotes the healing of wounds and improves shoot growth while reducing root loss caused by the "Bonsai effect". The result is better-looking foliage and rapid root regeneration resulting in well-formed and more abundant flowers and fewer days to market.



EndoFine is equally beneficial to growers in the production of miniature as well as bouquet rose crops.



Please contact us for additional information and technical data.

Sylvan

Bioproducts, Inc.

ADJUVANTS plus

90 Glade Drive, Kittanning, PA 16201 • Phone: (866) 352-7520 • Fax: (724) 543-7583

www.sylvanbio.com

Exopolysaccharide from surface-liquid culture of *Clonostachys rosea* originates from autolysis of the biomass

Graciele Viccini · Thalita Romano Martinelli · Regielly Caroline Raimundo Cognialli ·
Rodrigo Otávio de Faria · Elaine Rosechrer Carbonero · Guilherme Lanzi Sassaki ·
David Alexander Mitchell

Received: 6 November 2008 / Revised: 25 January 2009 / Accepted: 2 February 2009 / Published online: 20 February 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract We describe the purification and chemical characterization of galactomannans that appear both in the biomass and the culture broth during surface-liquid culture of the fungus *Clonostachys rosea*, a common facultative saprophyte that has potential to be used as a biological control agent against several plant pathogenic fungi, insects and nematodes. The galactomannans from both sources had comparable ratios of Man, Gal and Glc and the similarity were confirmed by ^1H , ^{13}C NMR, HMQC, and COSY spectra. We propose that the galactomannan in the culture broth originates from autolysis of the biomass, based not only on the similarity that it has with the galactomannan extracted from the biomass but also on the fact that its concentration increased rapidly after glucose depletion from the medium, when biomass concentration was falling. Polysaccharides from *C. rosea* have not previously been characterized; we show that the characteristics of the galactomannans are consistent with those that have been reported for other members of the Bionectriaceae, the family to which *C. rosea* belongs.

Keywords Galactomannan · Bionectriaceae · NMR spectroscopy · *Gliocladium roseum* · Polysaccharides

Introduction

The fungus *Clonostachys rosea* (syn. *Gliocladium roseum*; teleomorph *Bionectria ochroleuca*) is a common facultative saprophyte in the soil with a worldwide distribution (Schroers et al. 1999). *C. rosea* has been reported as a biological control agent against several plant pathogenic fungi, including *Botrytis cinerea* (Sutton et al. 1997; Li et al. 2002, 2004; Morandi et al. 2003), *Didymella rabiei* (Dugan et al. 2005), *Alternaria radicina* and *A. dauci* (Jensen et al. 2004). It has also been used successfully against fungi of the pea root rot complex (Xue 2003). Recent studies have also shown *C. rosea* as a pathogen of the insects *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Toledo et al. 2006), and as a facultative parasite of pathogenic nematodes (Zhao et al. 2005; Li et al. 2006).

The success of *C. rosea* as a biocontrol agent involves diverse modes of action, including mycoparasitism (Barnett and Lilly 1962; Yu and Sutton 1997; Li et al. 2002; Xue 2003), competition for nutrients or substrate (Sutton and Peng 1993; Sutton et al. 1997; Morandi et al. 2008), and induction of resistance in the host plant (Sutton et al. 1997). The mycoparasitism of fungal targets has been studied by several workers. The hyphae of *C. rosea* entwine and then penetrate the hyphae of the target fungus (Barnett and Lilly 1962; Xue 2003). Li et al. (2002) showed that *C. rosea* penetrated conidia and germ tubes of *B. cinerea* without the formation of appressoria. The indentations and breakage of cell walls of *B. cinerea* that occurred at each penetration site were taken as evidence that hyphae of *C. rosea* use mechanical force to overcome the cell wall barrier during the infection process. The mycoparasitic activity is also suggested to involve the secretion of cell wall degrading

Communicated by Geoffrey Turner.

G. Viccini · T. R. Martinelli · R. C. R. Cognialli · R. O. de Faria ·
E. R. Carbonero · G. L. Sassaki · D. A. Mitchell (✉)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,
Universidade Federal do Paraná, Cx.P. 19046 Centro Politécnico,
Curitiba, Paraná 81531-980, Brazil
e-mail: davidmitchell@ufpr.br

enzymes, including chitinases, glucanases and cellulases (Goedegebuur et al. 2002; Inglis and Kawchuk 2002; Lübeck et al. 2002).

The mechanical and chemical properties of the cell wall of *C. rosea* must play an important role in its mycoparasitism: The fungal cell wall not only protects cells against hostile conditions, such as those that a biocontrol agent faces when dispersed in the environment, but also mediates interactions with cells of other organisms (Rosado et al. 2007). However, the composition of the cell wall of *C. rosea* has not been previously studied, so as yet we have no basis for understanding its role within these phenomena. In the present, work we describe the purification and chemical characterization of a galactomannan that appears both in the cell wall and the culture broth during surface-liquid culture of *C. rosea*.

Materials and methods

Culture maintenance and preparation of inoculum

C. rosea strain GP04 was originally isolated at EMBRAPA-Grape and Wine (Bento Gonçalves, Rio Grande de Sul, Brazil) and supplied by EMBRAPA-Environment (Jaguariúna, São Paulo, Brazil). It was maintained on potato dextrose agar (PDA) (BioBRÁS Diagnósticos) slants at 4°C. Two agar plugs (0.5 mm diameter) from PDA cultures were shaken in a test tube with 10 mL of 0.01% Tween 20 in sterile distilled water. An aliquot of 0.3 mL was spread across the surface of a PDA plate, which was then incubated at 24°C under constant fluorescent light (“daylight” lamps, 20 W) for 8 days. After adding 20 mL sterile water, the surface was scraped with a sterile spatula. The concentration of this spore suspension was adjusted to 1×10^7 spores mL⁻¹.

Liquid surface culture

Two initial glucose concentrations were used, 10.2 and 26.6 g L⁻¹. These cultures involved 500 mL Erlenmeyer flasks each with 85 mL distilled water, 0.6 g NaNO₃, 0.15 g KH₂PO₄, 0.05 g KCl, 0.05 g MgSO₄·7H₂O, 0.001 g FeSO₄, 0.001 g ZnSO₄ and a 15 mL aliquot of an aqueous glucose solution, sufficient to give the desired final concentration. 57-day cultures were done in replicate flasks, with three flasks removed at each sampling time. The subsequent 21-day culture involved 2,000 mL Erlenmeyer flasks, each with 240 mL distilled water with salts and 2.5 g of glucose dissolved in 10 mL distilled water. For all cultures, the two solutions were autoclaved separately at 121°C for 15 min, then the glucose was added aseptically to the flasks. Inocula

comprising 5 mL and 12.5 mL of spore suspension were used for the 500 mL and 2,000 mL flasks, respectively. In both cases, flasks were incubated, without shaking, at 24°C under constant light (“daylight” lamps, 20 W).

Analysis of the 500 mL cultures

Biomass was removed by vacuum filtration through filter paper (J. Prolab, Qualy®, 12.5 cm diameter, pore size 14 µm) and dried to constant weight at 60°C. An aliquot of 0.5 mL of filtrate was stored at -18°C for later determination of the residual glucose concentration by the Glucose Oxidase Method (GOD-PAP, Kovalent do Brasil Ltda). The rest of the filtrate was added to excess absolute ethanol (3:1; v/v), stirred vigorously and left overnight at 4°C. The precipitated polysaccharide (EPS) was collected by centrifugation at 7,660×g for 15 min at 4°C and the supernatant was discarded. The EPS was dialysed (cut-off 8 kDa), and the retained fraction was lyophilized and weighed. Since these samples were not further purified, the values plotted in the cultivation profiles represent crude EPS levels.

Extraction and purification of biomass polysaccharide and exopolysaccharide

The biomass from the 21-day cultivation was removed by filtration through Qualy® filter paper. Figure 1 shows the scheme for extraction and purification of biomass polysaccharide. The filtered biomass (23.9 g) was defatted with CHCl₃-MeOH (2:1 v/v, 25°C for 24 h, extracted 2×) and the residual material was extracted with water (100°C for 6 h, extracted 14×). The combined aqueous extracts were evaporated to a small volume and the polysaccharide was precipitated by addition to excess ethanol (3:1; v/v), giving the biomass polysaccharide fraction (BP). BP was dissolved in distilled water and dialyzed through membranes of 8 and 12 kDa cut-off to remove low-molecular weight components. Freeze-thawing of the fraction retained by the 12 kDa cut-off membrane (12R-BP) gave precipitate (P-BP) and supernatant (S-BP) fractions, which were separated by centrifugation (15 min, 7,660×g, 4°C). Fraction S-BP was further fractionated by dialysis through a series of membranes with different exclusion limits (50, 100, 500, and 1,000 kDa cut-off, Spectra-Por® Biotech Polyvinylidene difluoride (PVDF)), giving rise to eluted and retained fractions. In this process, the retained fraction of each membrane was dialyzed with the membrane of the next larger cut-off.

The EPS in the filtered culture medium was precipitated using the same procedure as described above for the 500 mL culture, giving fraction E. Figure 2 shows the

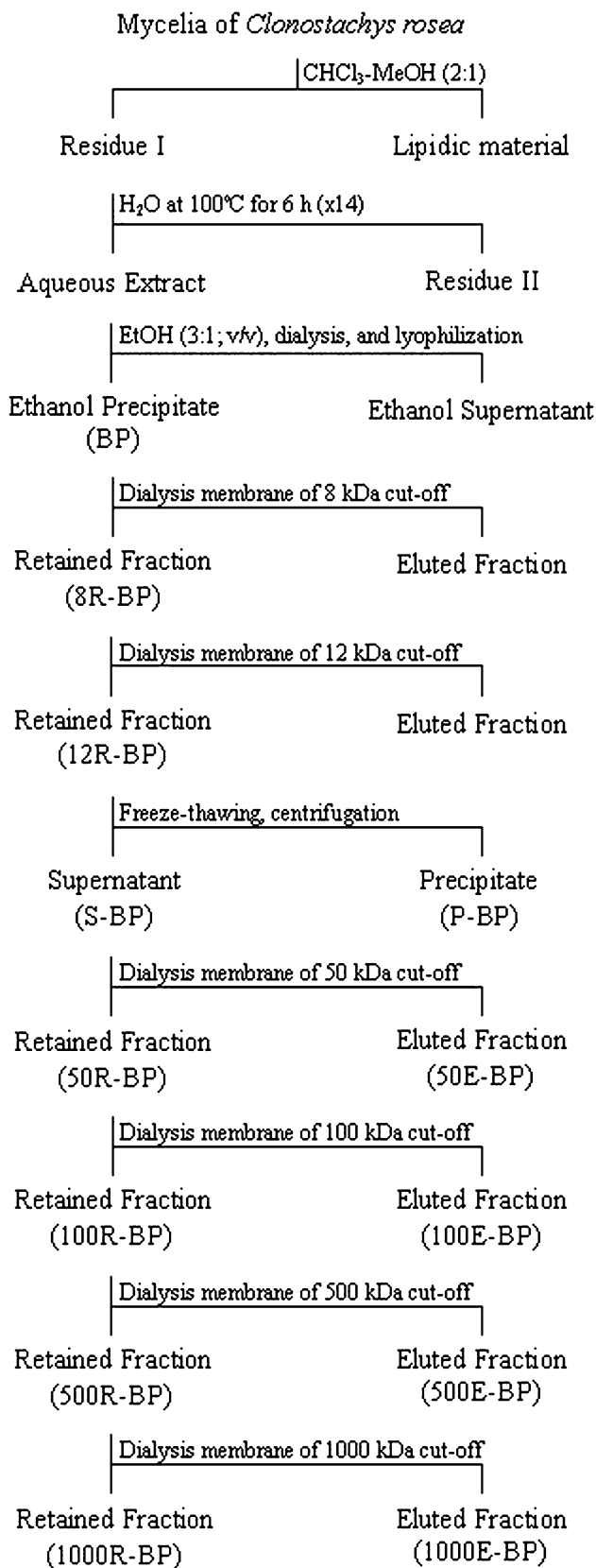


Fig. 1 Protocol for the extraction and purification of the biomass polysaccharide from *C. rosea*

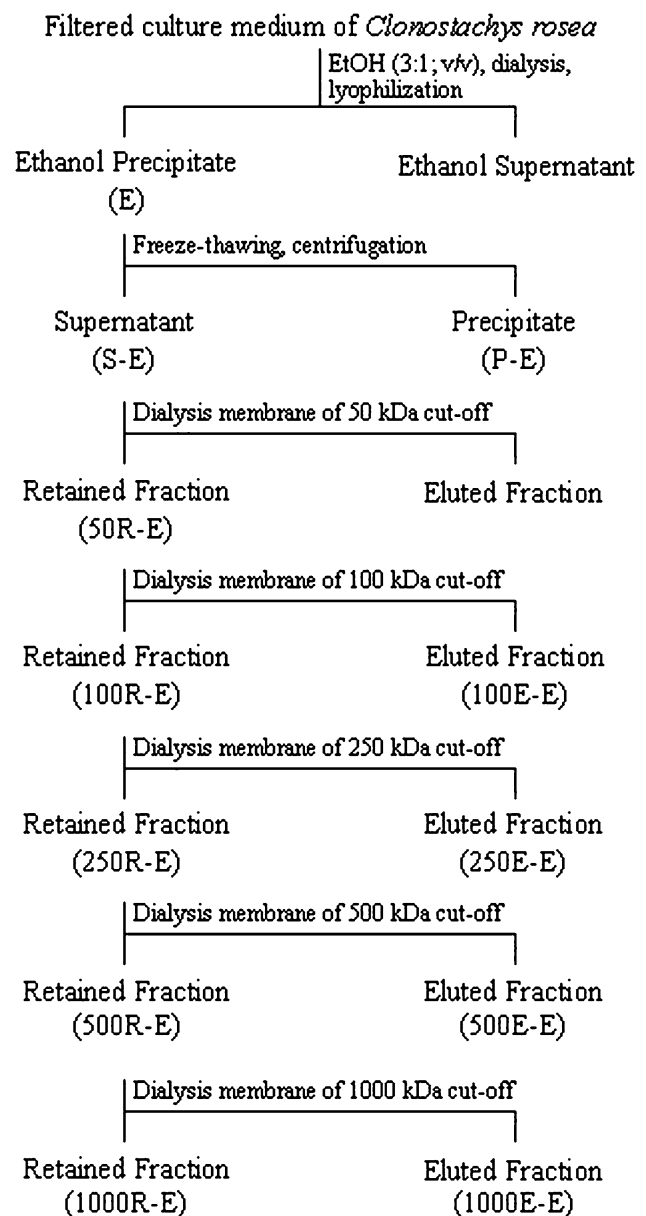


Fig. 2 Protocol for the extraction and purification of the exopolysaccharide from *C. rosea*

scheme for extraction and purification of EPS. The lyophilized material was dissolved in water and submitted to freeze-thawing, which furnished precipitate (P-E) and supernatant (S-E) fractions, which were separated by centrifugation (15 min, $7,660\times g$, 4°C). Fraction S-E was further fractionated by dialysis through membranes with different exclusion limits (50, 100, 250, 500, and 1,000 kDa cut-off, Spectra-Por® Biotech, PVDF), giving rise to eluted and retained fractions. In this process, the retained fraction of each membrane was dialyzed with the membrane of the next larger cut-off.

Monosaccharide composition

Each fraction (1 mg) was hydrolyzed with 1 M TFA at 100°C for 8 h and then evaporated to dryness. The residue was successively reduced with excess of NaBH₄ and acetylated with Ac₂O–pyridine (1:1, v/v; 2 mL) at room temperature for 12 h (Wolfrom and Thompson 1963a, b; Sassaki et al. 2008). The resulting alditol acetates were analyzed by GC–MS, using a Varian model 3800 gas chromatograph coupled to a Varian-Ion-Trap (model Saturn 2000R) mass spectrometer, with a DB-225 capillary column (30 m × 0.25 mm i.d.). The chromatograph temperature was held at 50°C during injection and then increased at 40°C min⁻¹ to 220°C (constant). The carrier gas was helium (Sassaki et al. 2008).

High-pressure size-exclusion chromatography (HPSEC) analysis

Samples containing polysaccharide were analyzed using a Waters high-performance size-exclusion chromatograph. Four columns of Waters Ultrahydrogel (2,000, 500, 250, and 120) were connected in series and coupled to a multi-detection system. The polysaccharide was dissolved in a 0.1 M NaNO₂ solution that contained NaN₃ (0.5 g L⁻¹), filtered through a 0.22 µm membrane (Millipore) and injected (200 or 100 µl loop) at a 1 mg/mL concentration.

Methylation analysis

Fractions 1000E-BP and 1000E-E (2 mg each) were methylated according to Ciucanu and Kerek (1984), by dissolution in Me₂SO, followed by addition of powdered NaOH and MeI. Each mixture was agitated strongly for 30 min and then left for 18 h. The per-*O*-methylated products were extracted with CHCl₃ from aqueous solutions and hydrolyzed with 50% v/v H₂SO₄ (0.5 mL) at 0°C for 1 h, followed by dilution to 8% v/v. The solution was maintained at 100°C for 20 h (Saeman et al. 1954), successively neutralized (BaCO₃), filtered, reduced with NaBD₄, and acetylated as described above to give a mixture of partially *O*-methylated alditol acetates. These were analyzed by GC–MS and identified by their typical retention times and electron impact spectra (Sassaki et al. 2005a; Prieto et al. 2007).

Spectroscopic methods

¹³C NMR, ¹H NMR, HMQC and COSY spectra were obtained using a Bruker Advance DRX400 NMR spectrometer, equipped with a 5 mm inverse probe, at a base frequency of 100.63 MHz for ¹³C and 400 MHz for ¹H nuclei. ¹³C NMR analyses were performed at 70°C in D₂O solutions. The ¹H NMR and ¹³C HMQC analyses were

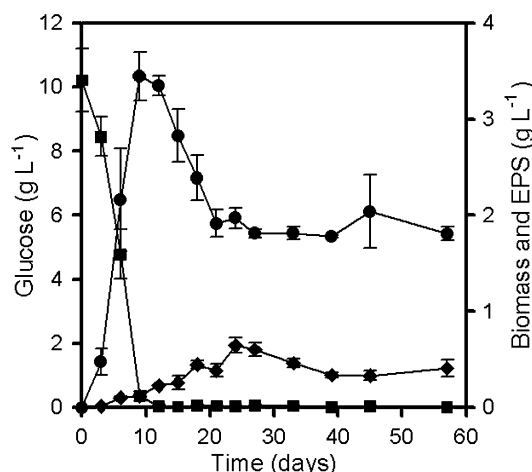


Fig. 3 Profiles for (filled circle) total biomass (filled diamond) crude EPS and (filled square) glucose consumption during surface culture of *C. rosea* using minimal medium with 10.2 g L⁻¹ glucose. The results are expressed as the average of triplicates ± S.E

performed at 50°C in D₂O. Chemical shifts of the samples are expressed in ppm (δ) relative to external acetone standard at 30.2 and 2.22 ppm for ¹³C and ¹H, respectively.

Results

Surface culture of *C. rosea* and initial characterization of the polysaccharides

When *C. rosea* was cultivated in surface culture using minimal medium with 10.2 g L⁻¹ of glucose, the amount of biomass increased initially, reaching 3.4 g L⁻¹ at day 9 (Fig. 3). During this period, glucose fell to 0.4 g L⁻¹ while the EPS concentration increased to 0.1 g L⁻¹. On the 9th day, the yield of biomass from glucose was 0.35 g g⁻¹. After day 9, the biomass concentration began to fall, stabilizing at around 2 g L⁻¹ from day 21 onwards. After day 9, the amount of EPS increased significantly, reaching a maximum of 0.6 g L⁻¹ at day 24 and then fell off, reaching values around 0.4 g L⁻¹ from day 40 onwards.

A 21-day culture was done in 2,000 mL Erlenmeyer flasks to produce sufficient material to enable preliminary characterization of the polysaccharides. Both the biomass polysaccharide and the EPS contain significant amounts of mannose, galactose and glucose (Table 1). Notably, both polysaccharides have a very similar composition, which also remains relatively constant for the different fractions obtained at various stages of the purification process.

The fractions eluted with the 1,000 kDa cut-off membrane were homogeneous for both the biomass polysaccharide (1000E-BP) and the EPS (1000E-E), as determined by HPSEC (results not shown). Hereafter these fractions will

Table 1 Monosaccharide composition, at various stages of the purification process, of biomass polysaccharide and the EPS obtained from the culture medium, after 21 days of culture of *C. rosea*

Fractions	Biomass polysaccharide			Exopolysaccharide		
	Label	Mass (g)	Man:Gal:Glc (%) ^a	Label	Mass (g)	Man:Gal:Glc (%) ^a
Precipitated by ethanol	BP	1.68	32:40:28	E	7.34	36:37:27
Supernatant from freeze-thawing	S-BP	0.81	31:43:26	S-E	1.51	35:41:24
Precipitate from freeze-thawing	P-BP	0.42	33:29:38	P-E	4.76	43:22:35
Eluted with 50 kDa membrane	50E-BP	0.13	37:37:26	50E-E	0.78	57:24:19
Retained by 50 kDa membrane	50R-BP	0.59	29:45:26	50R-E	0.44	32:45:23
Eluted with 100 kDa membrane	100E-BP	0.13	37:37:26	100E-E	0.04	56:28:16
Retained by 100 kDa membrane	100R-BP	0.41	25:38:37	100R-E	0.39	29:47:24
Eluted with 250 kDa membrane				250E-E	0.08	54:31:15
Retained by 250 kDa membrane				250R-E	0.29	32:45:23
Eluted with 500 kDa membrane	500E-BP	0.02	26:43:31	500E-E	0.03	47:34:19
Retained by 500 kDa membrane	500R-BP	0.32	23:45:32	500R-E	0.25	29:48:23
Eluted with 1,000 kDa membrane	1000E-BP	0.13	25:47:28	1000E-E	0.19	23:48:29
Retained by 1,000 kDa membrane	1000R-BP	0.11	21:43:36	1000R-E	0.05	30:46:24

^a Analyzed on a DB-225 column by GC–MS after total hydrolysis, reduction and acetylation

be described as “purified”. These two fractions contained Man, Gal, and Glc in almost identical molar ratios, being 25:47:28 for the biomass polysaccharide and 23:48:29 for the EPS (Table 1). The similarity of the polysaccharides contained was confirmed by ¹³C NMR (Fig. 4). In each case the spectrum for the purified polysaccharide was quite similar to that of a fraction removed from one of the initial steps of the purification process (for biomass polysaccharide, compare Fig. 4a with b; for EPS, compare Fig. 4c with d). Further, the spectra for purified biomass polysaccharide (Fig. 4b) and purified EPS (Fig. 4d) were very similar.

Surface culture of *C. rosea* at higher initial glucose concentration

The results obtained from the original surface culture led us to hypothesize that the EPS was released by autolysis of the biomass, this autolysis being slow in the presence of glucose, but accelerating upon exhaustion of glucose. If this hypothesis were true then (1) the addition of more glucose to the culture medium would lead to a delay in the increase of EPS production in relation to our original experiment, and (2) the EPS composition should remain similar to that of the biomass polysaccharide.

We checked the first prediction by starting with a glucose concentration of 26.6 g L⁻¹, which is about 2.5-fold greater than for the original surface culture experiment. Glucose was essentially exhausted (0.02 g L⁻¹) on day 18, at which time the biomass level had reached 9.4 g L⁻¹ (Fig. 5). The yield coefficient of biomass from glucose on

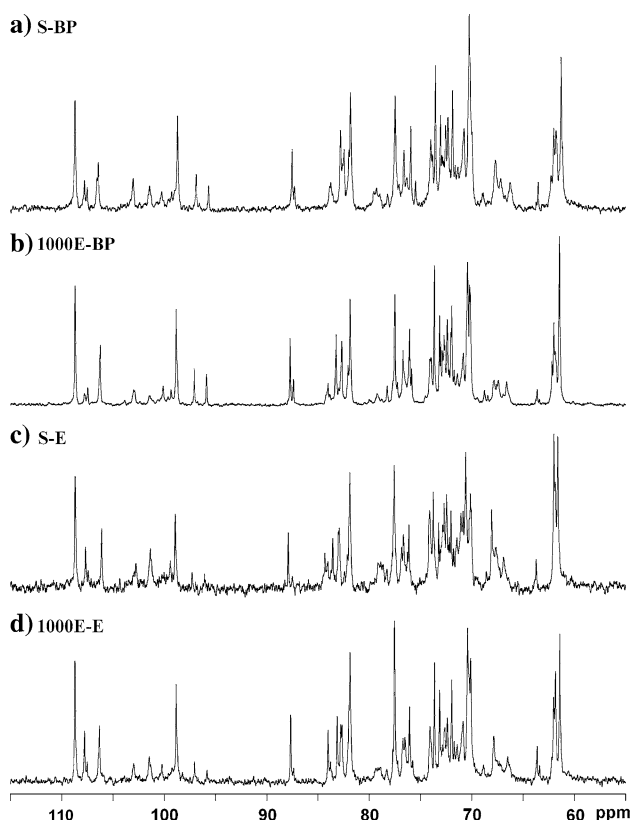


Fig. 4 ¹³C NMR spectra of fractions of the biomass polysaccharide and the EPS, obtained near the beginning and at the end of the purification process. (a) Fraction S-BP; (b) Fraction 1000E-BP (final homogeneous fraction); (c) S-E and (d) 1000E-E (final homogeneous fraction). Samples were dissolved in D₂O at 70°C and chemical shifts are expressed as δ ppm

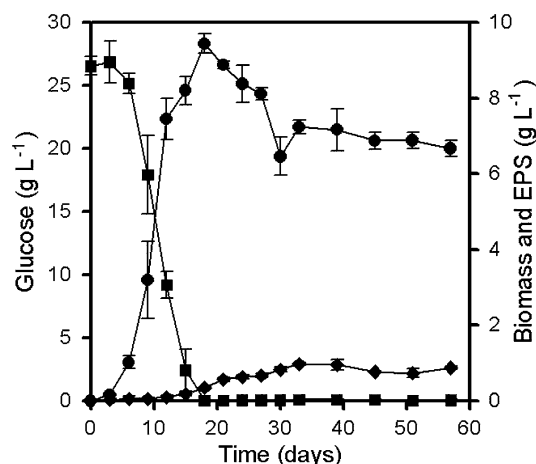


Fig. 5 Profiles for (filled circle) total biomass (filled diamond) crude EPS and (filled square) glucose consumption during surface culture of *C. rosea* using minimal medium with 26.6 g L⁻¹ glucose. The results are expressed as the average of triplicates \pm S.E

day 18, 0.36 g g⁻¹, was very similar to that reached on day 9 of the previous experiment. After day 18 the biomass level fell, forming a plateau at approximately 7 g L⁻¹ from day 30 onwards. As in the previous experiment, the EPS levels initially increased slowly. As predicted, the acceleration in EPS production was delayed: it occurred after day 15, when glucose levels were quite low and biomass production had decelerated significantly. The EPS level reached a maximum of 1.0 g L⁻¹ at day 33 and then fell, leveling out at approximately 0.8 g L⁻¹ from day 45 onwards.

We checked the second prediction by determining the monosaccharide compositions of EPS in samples removed at various times during both the original culture (10.2 g L⁻¹) and the second culture (26.6 g L⁻¹). In both cases, the compositions remained reasonably close to that of the biomass polysaccharide, although there was a general tendency for the proportion of glucose to decrease (Fig. 6). The profiles from the two cultures were very similar.

Structural studies of the biomass polysaccharide and EPS from *C. rosea*

The similarity of the biomass polysaccharide (1000E-BP) and the EPS (1000E-E), which was indicated by their ¹³C NMR spectra (Fig. 4b, d), was confirmed by their ¹H NMR spectra. These spectra had a very similar pattern (Fig. 7), although the relative intensities of some of the peaks were different. These two polysaccharides appear to have a complex structure, based on the fact that the anomeric regions gave 10 signals in the ¹³C NMR spectra and at least eight signals in the ¹H NMR spectra.

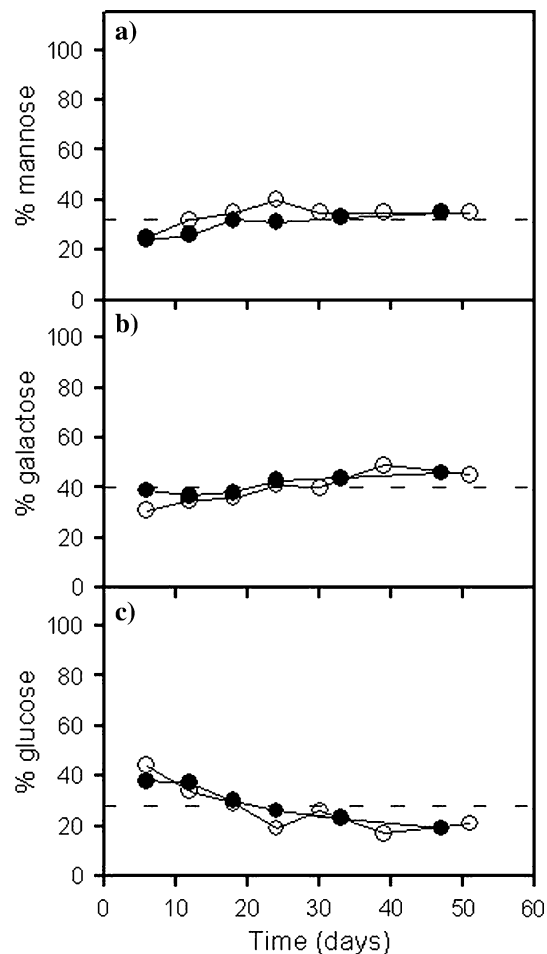


Fig. 6 Profiles for monosaccharide compositions of EPS: (a) Man (b) Gal and (c) Glc. Key: (filled circle) the original culture (initial glucose 10.2 g L⁻¹) and (open circle) the second culture (initial glucose 26.6 g L⁻¹). In each case, the horizontal dashed lines represent the composition of the biomass polysaccharide (fraction BP in Table 1)

The similarity of fractions 1000E-BP and 1000E-E was further confirmed by the methylation analysis (Table 2). Both contained 2-*O*-substituted glucopyranose, indicating linkages “ \rightarrow 2)-Glc_p-(1 \rightarrow ”, and terminal residues of glucopyranose “Glc_p-(1 \rightarrow ”. They also contained galactofuranose substituted in four different manners: (i) 5-*O*-substituted, indicating linkages “ \rightarrow 5)-Gal_f-(1 \rightarrow ”; (ii) 6-*O*-substituted, indicating linkages “ \rightarrow 6)-Gal_f-(1 \rightarrow ”; (iii) 5,6-di-*O*-substituted, indicating a branch point “ \rightarrow 5,6)-Gal_f-(1 \rightarrow ”; and (iv) 2,6-di-*O*-substituted, indicating another type of branch point, “ \rightarrow 2,6)-Gal_f-(1 \rightarrow ”. These fractions also contained mannopyranose, substituted in three different manners: (i) 2-*O*-substituted, indicating linkages “ \rightarrow 2)-Man_p-(1 \rightarrow ”; (ii) 6-*O*-substituted, indicating linkages “ \rightarrow 6)-Man_p-(1 \rightarrow ”; and (iii) 2,6-di-*O*-substituted, indicating a branch point of the type “ \rightarrow 2,6)-Man_p-(1 \rightarrow ”.

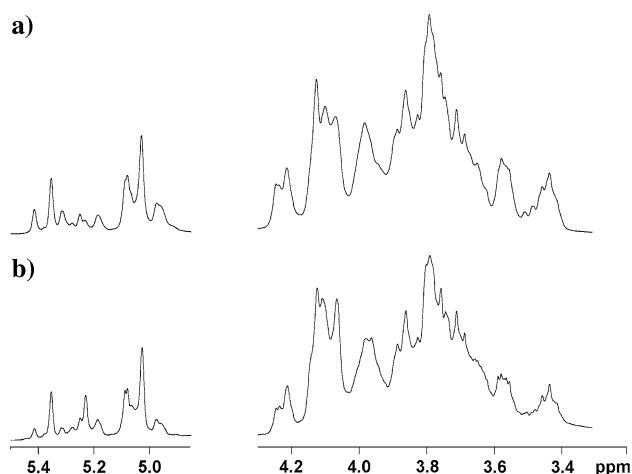


Fig. 7 ^1H NMR spectra of (a) the purified biomass polysaccharide fraction 1000E-BP and (b) purified exopolysaccharide fraction 1000E-E

Table 2 Partially *O*-methylated alditol acetates formed on methylation analysis of the homogenous fractions 1000E-BP and 1000E-E

Partially <i>O</i> -methylated alditol acetates	Parent linkage	Fractions	
		1000E-BP (%)	1000E-E (%)
2,3,4,6-Me ₄ -Man	Manp-(1→	2	2
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	Glc p-(1→	20	17
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	Gal f-(1→	2	4
3,4,6-Me ₃ -Man	→2)-Manp-(1→	7	11
3,4,6-Me ₃ -Glc	→2)-Glc p-(1→	6	5
2,3,6-Me ₃ -Gal	→5)-Gal f-(1→	19	21
2,3,4-Me ₃ -Man	→6)-Manp-(1→	10	8
2,3,5-Me ₃ -Gal	→6)-Gal f-(1→	4	8
3,4-Me ₂ -Man	→2,6)-Manp-(1→	10	7
2,3-Me ₂ -Gal	→5,6)-Gal f-(1→	9	6
3,5-Me ₂ -Gal	→2,6)-Gal f-(1→	11	11

The chemical shifts obtained in the ^1H , ^{13}C NMR, ^{13}C HMQC, and COSY experiments confirmed the presence of the majority of the residues indicated by the methylation analysis (Table 3). The presence of the four different Gal f units was confirmed by their HMQC spectra, with fraction 1000E-BP giving four C-1/H-1 signals at δ 108.7/5.03, 107.8/5.25, 107.4/5.25, and 106.3/5.35 and fraction 1000E-E giving signals at δ 108.7/5.03, 107.8/5.23, 107.5/5.23, and 106.3/5.36 (Ahrazem et al. 2001b; Leal et al. 1997; Prieto et al. 1997). The low-field C-1 signals showed that the anomeric carbons of all the Gal f units are in the α configuration (Perlin and Casu 1969; Gorin and Mazurek 1975; Sasaki et al. 2005b). In the

case of the mannopyranose residues, weaker signals were detected in the ^1H NMR and HMQC spectra for these fractions. It was impossible to identify the chemical shifts of all the carbons and protons but characteristic C-1/H-1 (or at least C-1) signals can be assigned for 2-*O*-, 6-*O*-, and 2,6-di-*O*-substituted α -mannopyranosyl residues at δ 101.4/5.23, 100.1, and 99.3 for 1000E-BP and 101.4/5.23, 100.2, and 99.2 for 1000E-E (Gorin and Iacomini 1985; Leal et al. 1996; Gómez-Miranda et al. 2004; Prieto et al. 2008). Finally, the α -configuration of non-reducing end of Glc p was deduced from C-1/H-1 signals at δ 98.9/5.08 for 1000E-BP and at 98.8/5.08 for 1000E-E (Ahrazem et al. 1997, 2006) (Table 3).

Discussion

To the best of our knowledge, the current work represents the first characterization of a polysaccharide from *C. rosea*. Two conclusions can be drawn from our work. Firstly, the EPS that appears in the culture broth is very similar to the biomass polysaccharide that we characterized. Secondly, the biomass polysaccharide is similar to biomass polysaccharides that have already been reported for other members of the family to which *C. rosea* belongs.

Origin of the EPS of *C. rosea*

The galactofuranose-rich EPS that we recovered from the culture broth is very similar to the biomass polysaccharide that we characterized. This phenomenon has been reported for other fungi. For example, the cell wall galactomannan of *A. fumigatus* is also found in the culture filtrate (Stynen et al. 1992) while the cell walls of several *Penicillium* and *Talaromyces* species (Parra et al. 1994; Leal et al. 1997) contain a polysaccharide that is very similar to varianose, an EPS produced by *Penicillium varians* (Jansson and Lindberg 1980). Also, a β -(1→5)-galactofuranan that forms part of the extracellular peptidophosphopolysaccharide of *Penicillium charlesii* (Gander et al. 1974) also occurs as a cell wall component of this species (Gander and Fang 1976) and of several other *Penicillia* (Leal et al. 1997).

EPS levels remained low until the glucose in the medium neared exhaustion, with the largest increase in EPS levels being concomitant with the fall in biomass level (Figs. 3, 5). Ahrazem et al. (2001a) noted a similar phenomenon and suggested that in this case the EPS represents cell wall components released during the autolysis of the mycelium. If their hypothesis is correct, our work suggests that only the more easily extractable cell wall polysaccharides are released during autolysis. The

Units		Proton or carbon for 1000E-BP								Proton or carbon for 1000E-E						
		1	2	3	4	5	6a	6b		1	2	3	4	5	6a	6b
→5)-β-Galf-(1 → ^a	H	5.03	4.13	4.10	4.10	3.98	3.79	3.79	H	5.03	4.13	4.11	4.11	3.97	3.79	3.79
	C	108.7	81.9	77.5	82.7	76.7	62.0		C	108.7	81.9	77.6	82.7	76.5	61.9	
→6)-β-Galf-(1 → ^a	H	5.25	4.13	4.10	4.07	3.98	3.62	3.88	H	5.23	4.13	4.07	4.07	3.98	3.64	3.89
	C	107.8	82.1	77.5	84.0	70.4	70.2		C	107.8	81.9	77.6	84.0	70.4	70.1	
→5,6)-β-Galf-(1 → ^b	H	5.25	–	–	–	–	–	–	H	5.23	–	–	–	–	–	–
	C	107.4	–	–	–	–	–		C	107.5	–	–	–	–	–	
→2,6)-β-Galf-(1 → ^c	H	5.35	4.21	4.21	4.07	3.98	3.89	3.63	H	5.36	4.22	4.22	4.07	3.98	3.89	3.64
	C	106.3	87.7	76.1	83.2	70.4	70.2		C	106.3	87.7	76.1	83.1	70.4	70.1	
→2)-α-Manp-(1 → ^d	H	5.23	–	–	–	–	3.86	3.76	H	5.23	–	–	–	–	3.89	3.76
	C	101.4	79.2	–	–	–	61.9		C	101.4	78.9	–	–	–	61.9	
→6)-α-Manp-(1 → ^d	H	–	–	3.83	–	–	3.99	3.76	H	–	–	–	–	–	–	–
	C	100.1	70.8	71.4	67.4	–	66.6		C	100.2	70.9	–	–	–	66.5	
→2,6)-α-Manp-(1 → ^d	H	–	4.07	–	–	–	3.98	3.76	H	–	4.07	–	–	–	3.98	3.76
	C	99.3	79.2	–	–	–	66.6		C	99.2	79.4	–	–	–	66.5	
α-Glcp-(1 → ^e	H	5.08	3.58	3.71	3.44	3.76	3.86	3.76	H	5.08	3.58	3.71	3.44	3.76	3.86	3.76
	C	98.9	71.9	73.7	70.4	73.2	61.5		C	98.8	72.0	73.7	70.4	73.2	61.4	

– Not determined

Although we extracted with boiling water, our data are consistent with these structures. The various mannose units that we found would come from the core while the “→5)-β-GalF-(1→” and “→6)-β-GalF-(1→”, units identified by our methylation analysis are consistent with the galactofuranose chains of these structures. We also detected the terminal glucose units.

An interesting feature of our results is the presence of “→2)-GlcP-(1→” units, which do not appear in the structures shown above. Note that “→2)-GlcP-(1→” units are not particularly common in fungal galactomannans, but they have been found as trace components of the FISS extract of another ascomycete, *Acrospermum compressum* (Prieto et al. 2007).

The galactomannan of *C. rosea* deserves further attention, since the cell-wall surface molecules of fungi play a significant role in fungus-host interactions (Rosado et al. 2007). In fact, galactofuranose residues, which form part of both the biomass polysaccharide and EPS of *C. rosea*, have been suggested by some authors to be involved directly in recognition mechanisms (Suzuki et al. 1997; Levery et al. 1998; Cordeiro et al. 2005). An opportunity for future studies may lie in the strategy that Schmalhorst et al. (2008) applied to *Aspergillus fumigatus*. They deleted *glfA*, a gene that codes for UDP-galactopyranose mutase, a key enzyme of galactofuranose metabolism. The resulting mutant was devoid of galactofuranose. If such a targeted deletion were applied to *C. rosea*, it would be possible to gain an insight into the importance that the galactanofuranose residues in the cell wall of *C. rosea* have for its mycoparasitic action.

Acknowledgments The work was supported financially by PRONEX-Carbohidratos and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), a Brazilian government agency for the advancement of science and technology. Research scholarships were granted to Graciele Viccini, Thalita Romano Martinnelli, Rodrigo Otávio de Faria, Guilherme Lanzi Sassaki, and David Alexander Mitchell by CNPq and to Elaine Rosechrer Carbonero by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil).

References

- Ahrazem O, Prieto A, Leal JA, Gómez-Miranda B, Domenech J, Jiménez-Barbero J, Bernabé M (1997) Structural elucidation of acidic fungal polysaccharides isolated from the cell-wall of genera *Cylindrocladium* and *Calonectria*. Carbohydr Res 303:67–72. doi:10.1016/S0008-6215(97)00145-6
- Ahrazem O, Leal JA, Prieto A, Jiménez-Barbero J, Bernabé M (2001a) Chemical structure of a polysaccharide isolated from the cell wall of *Arachnoidia erruculosus* and *A. rubber*. Carbohydr Res 336:325–328. doi:10.1016/S0008-6215(01)00273-7
- Ahrazem O, Prieto A, Gómez-Miranda B, Bernabé M, Leal JA (2001b) Comparison of cell-wall polysaccharides from *Nectria cinnabarina* with those from the group of *Nectria* with *Sesquicillium* anamorphs. Microbiology 147:1839–1849
- Ahrazem O, Prieto A, Giménez-Abián MA, Leal JA, Jiménez-Barbero J, Bernabé M (2006) Structural elucidation of fungal polysaccharides isolated from the cell wall of *Plectosphaerella cucumerina* and *Verticillium* spp. Carbohydr Res 341:246–252. doi:10.1016/j.carres.2005.10.021
- Barnett HL, Lilly VG (1962) A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum*. Mycologia 54:72–79
- Ciucanu I, Kerek F (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydr Res 131:209–217. doi:10.1016/0008-6215(84)85242-8
- Cordeiro LMC, Carbonero ER, Sassaki GL, Reis RA, Wörgötter ES, Gorin PAJ, Iacomini M (2005) A fungus-type β-galactofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*. FEMS Microbiol Lett 244:193–198. doi:10.1016/j.femsl.2005.01.040
- Dugan FM, Lupien SL, Hernandez-Bello M, Peever TL, Chen W (2005) Fungi resident in chickpea debris and their suppression of growth and reproduction of *Didymella rabiei* under laboratory conditions. J Phytopathol 153:431–439. doi:10.1111/j.1439-0434.2005.00996.x
- Gander JE, Fang F (1976) The occurrence of ethanolamine and galactofuranosyl residues attached to *Penicillium charlesii* cell wall saccharides. Biochem Biophys Res Commun 71:719–725. doi:10.1016/0006-291X(76)90890-1
- Gander JE, Jentoft NH, Drewes LR, Rick PD (1974) The 5-O-β-D-galactofuranosyl-containing exocellular glycopeptide of *Penicillium charlesii*. J Biol Chem 249:2063–2072
- Goedegebuur F, Fowler T, Phillips J, Van der Kley P, Van Solingen P, Dankmeyer L, Power SD (2002) Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. Curr Genet 41:89–98. doi:10.1007/s00294-002-0290-2
- Gómez-Miranda B, Prieto A, Leal JA, Ahrazem O, Jiménez-Barbero J, Bernabé M (2004) Differences among the cell wall galactomannans from *Aspergillus wentii* and *Chaetosartorya chrysella* and that of *Aspergillus fumigatus*. Glycoconjugate J 20:239–246. doi:10.1023/B:GLYC.0000025818.83019.e4
- Gorin PAJ, Iacomini M (1985) Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. Carbohydr Res 142:253–267. doi:10.1016/0008-6215(85)85027-8
- Gorin PAJ, Mazurek M (1975) Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. Can J Chem 53:1212–1223. doi:10.1139/v75-168
- Inglis GD, Kawchuk LM (2002) Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. Can J Microbiol 48:60–70. doi:10.1139/w01-130
- Jansson PE, Lindberg B (1980) Structural studies of varianose. Carbohydr Res 82:97–102. doi:10.1016/S0008-6215(00)85523-8
- Jensen B, Knudsen IMB, Madsen M, Jensen DF (2004) Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of seedborne *Alternaria* spp. Phytopathology 94:551–560. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.6.551
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev 26:239–256. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x
- Leal JA, Jiménez-Barbero J, Gómez-Miranda B, Prieto A, Domenech J, Bernabé M (1996) Structural investigation of a cell-wall galactomannan from *Neurospora crassa* and *N. sitophila*. Carbohydr Res 283:215–222. doi:10.1016/0008-6215(95)00400-9
- Leal JA, Gómez-Miranda B, Prieto A, Domenech J, Ahrazem O, Bernabé M (1997) Possible chemotypes from cell wall polysaccharides, as an aid in the systematics of *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Mycol Res 101:1259–1264. doi:10.1017/S0953756297004012

- Leverly SB, Toledo MS, Straus AH, Takahashi HK (1998) Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: an immunodominant β -galactofuranose residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen. *Biochemistry* 37:8764–8775. doi:10.1021/bi9730083
- Li GQ, Huang HC, Kokko EG, Acharya SN (2002) Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. *Bot Bull Acad Sin* 43:211–218
- Li GQ, Huang HC, Acharya SN, Erickson RS (2004) Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. *Plant Dis* 88:1246–1251. doi:10.1094/PDIS.2004.88.11.1246
- Li J, Yang J, Huang X, Zhang K (2006) Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochem* 41:925–929. doi:10.1016/j.procbio.2005.10.006
- Lübeck M, Knudsen IMB, Jensen B, Thrane U, Janvier C, Jensen DF (2002) GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. *Mycol Res* 106:815–826. doi:10.1017/S095375620200607X
- Morandi MAB, Maffia LA, Mizubuti ESG, Alfenas AC, Barbosa JG (2003) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in Botrytis blight management in commercial greenhouses. *Biol Control* 26:311–317. doi:10.1016/S1049-9644(02)00134-2
- Morandi MAB, Mattos LPV, Santos ER, Bonugli RC (2008) Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. *Crop Prot* 27:77–83. doi:10.1016/j.cropro.2007.04.008
- Odds FC, Brown AJP, Gow NAR (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *TRENDS Microbiol* 11:272–279. doi:10.1016/S0966-842X(03)00117-3
- Parra E, Jiménez-Barbero J, Bernabé M, Leal JA, Prieto A, Gómez-Miranda B (1994) Structural studies of fungal cell-wall polysaccharides from two strains of *Talaromyces flavus*. *Carbohydr Res* 251:315–325. doi:10.1016/0008-6215(94)84294-9
- Perlin AS, Casu B (1969) Carbon-13 and proton magnetic resonance spectra of D-glucose-¹³C. *Tetrahedron Lett* 10:2921–2924. doi:10.1016/S0040-4039(01)88308-8
- Prieto A, Leal JA, Poveda A, Jiménez-Barbero J, Gómez-Miranda B, Domenech J, Ahrazem O, Bernabé M (1997) Structure of complex cell wall polysaccharides isolated from *Trichoderma* and *Hypocrea* species. *Carbohydr Res* 304:281–291. doi:10.1016/S0008-6215(97)00239-5
- Prieto A, Leal JA, Giménez-Abián MI, Canales A, Jiménez-Barbero J, Bernabé M (2007) Isolation and structural determination of a unique polysaccharide containing mannofuranose from the cell wall of the fungus *Acrosporum compressum*. *Glycoconjugate J* 24:421–428. doi:10.1007/s10719-007-9032-5
- Prieto A, Leal JA, Bernabé M, Hawksworth DA (2008) A polysaccharide from *Lichina pygmaea* and *L. confines* supports the recognition of Lichinomycetes. *Mycol Res* 112:381–388. doi:10.1016/j.mycres.2007.10.013
- Rosado IV, Codón Rey M, AC Govantes J, Moreno-Mateos MA, Benítez T (2007) QID74 cell wall protein of *Trichoderma harzianum* is involved in cell protection and adherence to hydrophobic surfaces. *Fungal Genetics Biol* 44:950–964. doi:10.1016/j.fgb.2007.01.001
- Saeman JF, Moore WE, Mitchell RL, Millet MA (1954) Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Tappi J* 37:336–343
- Sasaki GL, Gorin PAJ, Souza LM, Czelusniak PA, Iacomini M (2005a) Rapid synthesis of partially *O*-methylated alditol acetate standards for GC–MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydr Res* 340:731–739. doi:10.1016/j.carres.2005.01.020
- Sasaki GL, Iacomini M, Gorin PAJ (2005b) Methylation-GC–MS analysis of arabinofuranose- and galactofuranose-containing structures: rapid synthesis of partially *O*-methylated alditol acetate standards. *An Acad Bras Cienc* 77:223–234
- Sasaki GL, Souza LM, Serrato RV, Cipriani TR, Gorin PAJ, Iacomini M (2008) Application of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectrometry: novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. *J Chromatogr A* 1208:215–222. doi:10.1016/j.chroma.2008.08.083
- Schmalhorst PS, Krappmann S, Vervecken W, Rohde M, Müller M, Braus GH, Contreras R, Braun A, Bakker H, Routier FH (2008) Contribution of galactofuranose to the virulence of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 7:1268–1277. doi:10.1128/EC.00109-08
- Schroers HJ, Samuels GJ, Seifert KA, Gams W (1999) Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *G. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia* 91:365–385
- Smits GJ, Van den Ende H, Klis FM (2001) Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* 147:781–794
- Stynen D, Sarfati J, Goris A, Prévost MC, Lesourd M, Kamphuis H, Darras V, Latgé JP (1992) Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus* Galactomannan. *Infect Immun* 60:2237–2245
- Sutton JC, Peng G (1993) Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* 83:615–621
- Sutton JC, Li D, Peng G, Yu H, Zhang P, Valdebenito-Sanhueza RM (1997) *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Dis* 81:316–328. doi:10.1094/PDIS.1997.81.4.316
- Suzuki E, Toledo MS, Takahashi HK, Straus AH (1997) A monoclonal antibody directed to terminal residue of β -galactofuranose of glycolipid antigen isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*: cross-reactivity with *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi*. *Glycobiology* 7:463–468. doi:10.1093/glycob/7.4.463
- Toledo AV, Virla E, Humber RA, Paradell SL, Lastra CCL (2006) First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. *J Invertebr Pathol* 92:7–10. doi:10.1016/j.jip.2005.10.005
- Wolf from ML, Thompson A (1963a) Reduction with sodium borohydride. *Meth Carbohydr Chem* 2:65–68
- Wolf from ML, Thompson A (1963b) Acetylation. *Meth Carbohydr Chem* 2:211–215
- Xue AG (2003) Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology* 93:329–335. doi:10.1094/PHYTO.2003.93.3.329
- Yu H, Sutton JC (1997) Effectiveness of Bumblebees and Honeybees for delivering inoculum of *Gliocladium roseum* to raspberry flowers to control *Botrytis cinerea*. *Biol Control* 10:113–122. doi:10.1006/bcon.1997.0562
- Zhao ML, Huang JS, Mo MH, Zhang KQ (2005) A potential virulence factor involved in fungal pathogenicity: serine-like protease activity of nematophagous fungus *Clonostachys rosea*. *Fungal Divers* 19:217–234